

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Markéta Sypecká

**Příprava, charakterizace a in-vitro ověření kvality syntetické mediátorové
ribonukleové kyseliny, kódující pankreatický transkripční faktor Pdx1**

Preparation, characterization and in vitro testing of synthetic messenger RNA encoding
pancreatic transcription factor Pdx1

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Tomáš Koblas, Ph.D.

Praha 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 20. května 2017

Markéta Sypecká

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Tomáši Koblasovi, Ph.D. za vstřícnost, ochotu pomoci a trpělivost při vypracování mé bakalářské práce, dále pak Mgr. Šárce Loukotové a Mgr. Ivanu Leontovyčovi za pomoc při práci v laboratoři. Na závěr bych chtěla poděkovat mé rodině a Sabině Tomáškové za podporu během studií.

OBSAH

| | |
|--|----|
| 1. ÚVOD | 6 |
| 1.1 Cíl bakalářské práce | 6 |
| 2. TEORETICKÁ ČÁST | 7 |
| 2.1 Diabetes mellitus 1. typu | 7 |
| 2.2 Vývoj pankreatických buněk | 8 |
| 2.2.1 Využití pluripotentních kmenových buněk – Buněčná terapie | 8 |
| 2.2.2 Pdx1 | 9 |
| 2.2.3 Syntetická mRNA | 10 |
| 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 12 |
| 3.1 Použitý materiál | 12 |
| 3.2 Použité přístroje | 12 |
| 3.3 Použité metody | 13 |
| 3.3.1 Amplifikace templátu pro syntézu mRNA | 13 |
| 3.3.2 In vitro transkripce | 13 |
| 3.3.3 Purifikace | 16 |
| 3.3.4 Defosforylace a polyadenylace | 17 |
| 3.3.5 Transfekce | 18 |
| 3.3.6 Imunofluorescenční stanovení exprese transkripčního faktoru Pdx1 | 18 |
| 3.3.7 Imunofluorescenční stanovení exprese transkripčního faktoru Pdx1 pro detekci pomocí fluorescenční průtokové cytometrie | 19 |
| 4. VÝSLEDKY | 21 |
| 5. DISKUSE | 36 |
| 6. ZÁVĚR | 39 |
| 7. Použitá literatura | 40 |

Seznam uvedených zkratk a symbolů

| | |
|--------------|---|
| 5mCTP | 5-methylcytidin-5'-trifosfát |
| ARCA | Převrácený analog čepičky (Anti Reverse Cap Analog) |
| ATP | Adenosin-5'-trifosfát |
| CTP | Cytidin-5'-trifosfát |
| DM1 | Diabetes mellitus 1. typu |
| DTT | Dithiotreitol |
| FACS | Průtoková cytometrie |
| GTP | Guanosin-5'-trifosfát |
| HBSS | Hankův vyvážený solný roztok (Hank's Balanced Salt solution) |
| mPUTP | 5'-methylpseudouridin-5'-trifosfát |
| mRNA | Mediátorová ribonukleová kyselina |
| PBS | Fosfátový pufr (Phosphate buffered saline) |
| Pdx1 | Pancreatic and duodenal homeobox 1 (nemá český ekvivalent) |
| RIG-I | Gen I vyvolaný kyselinou retinovou (Retinoic acid-inducible gene I) |
| SAM | S-adenosylmethionin |
| TTP | Thymidin-5'-trifosfát |
| UTP | Uridin-5'-trifosfát |

1. ÚVOD

Diabetes mellitus 1. typu je onemocnění, které je způsobeno autoimunitní destrukcí β buněk, které ve slinivce břišní produkují inzulín. Způsoby, kterými je lze nahradit jsou přímé podávání inzulínu do těla pacienta, transplantace slinivky, či pouze Langerhansových ostrůvků, které β buňky obsahují. Perspektivní metodou je buněčná terapie, kdy lze získat požadované buňky, v tomto případě β buňky, přeprogramováním vlastních buněk pacienta. Takové přeprogramování se provádí pomocí transkripčních faktorů, které ovlivní expresi určitých genů až na úroveň vývoje v konkrétní buňky. Nejdůležitějším transkripčním faktorem pro vývoj buněk pankreatu je transkripční faktor Pdx1. K získání co největšího množství tohoto transkripčního faktoru, je důležité zjistit podmínky, které jsou nejvhodnější pro přípravu syntetické mediátorové ribonukleové kyseliny tohoto transkripčního faktoru. Toho lze dosáhnout pomocí testování různých způsobů příprav *in vitro* transkripce.

1.1 Cíl bakalářské práce

Cílem této bakalářské práce je příprava modifikované syntetické mediátorové RNA pro transkripční faktor Pdx1 a ověření optimálních podmínek pro její přípravu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Diabetes mellitus 1. typu

Diabetes mellitus 1. typu, nebo také inzulín-dependentní cukrovka, je autoimunitní onemocnění projevující se destrukcí pankreatických β buněk. Tyto buňky jsou zodpovědné za tvorbu inzulínu a jejich destrukcí tedy dojde k nedostatku inzulínu v lidském těle, který se projeví zvýšenou hladinou glukózy v krvi, tedy hyperglykemií. Tato nemoc zpravidla postihuje děti či dospívající.

Mezi typické příznaky propuknutí této choroby patří polydipsie – zvýšená žízeň, polyurie – zvýšené vylučování moči a polyfagie – zvýšená chuť k jídlu, které jsou spojeny s projevy hyperglykemie. Touto nemocí jsou častěji postiženi muži. Jako autoimunitní onemocnění je cukrovka dědičná a její propuknutí může být spuštěno několika vlivy a to, ročním obdobím, virovou či bakteriální infekcí, kdy je tělo pod stresem, nebo látkami znečišťující životní prostředí (polutanty)¹.

Diabetes mellitus 1. typu (dále jen DM1) se v současné době léčí subkutánním podáváním inzulínu, který je aplikován inzulínovými pery či inzulínovou pumpou. Dalším způsobem léčby je pak transplantace slinivky nebo Langerhansových ostrůvků.

První transplantace slinivky byla provedena v roce 1966. Tento způsob léčby byl úspěšný a od té doby jich bylo celosvětově provedeno přes 25 000^{cit.2}. Nevýhodami jsou však náročný operativní zákrok, a hlavně nutnost podávat celoživotně imunosupresiva, která mají nežádoucí efekty včetně opětovného propuknutí cukrovky. Z tohoto důvodu byla vyvinuta technika k izolaci Langerhansových ostrůvků a jejich transplantaci k léčbě DM1^{cit.3}. V tomto případě se eliminovala nutnost operace, neboť ostrůvky jsou transplantovány do těla pacienta přes cévní systém⁴. Nicméně takto transplantované ostrůvky nemají delší životnost než 5 let.

Kvůli podobnosti prasečího a lidského inzulínu a úspěšné léčbě diabetiků podáním prasečího inzulínu, byly k transplantaci vyzkoušeny prasečí buňky. Bylo zjištěno, že k transplantaci těchto buněk je nutno je nejdříve zapouzdřit a některé pacienty postihly potíže, které nebyly výrazně negativní, nicméně tento způsob léčby není optimální⁵.

¹ Aruna V. Vanikar, Hargovind L. Trivedi, a Umang G. Thakkar

² Viz ¹

³ K. Kwang-Won a J. Sang-Man

⁴ M. A. Borisov et al.

⁵ Cara E. Ellis a Gregory S. Korbutt

Existují studie, popisující transplantaci lidských Langerhansových ostrůvků bez nutnosti imunomodulace, nicméně limitujícím faktorem stále zůstává nedostatek donorů⁶. Alternativní cestou transplantace je buněčná terapie pomocí kmenových buněk.

2.2 Vývoj pankreatických buněk

K objasnění postupů vedoucích k diferenciaci kmenových buněk na β buňky Langerhansových ostrůvků, je nutno nejdříve zmínit vývoj slinivky břišní *in vivo*. Slinivka břišní (pankreas) je orgán endodermálního původu, který vzniká z embryonálního střeva⁷. Vzniká spojením dorsálního a ventrálního výchlipku mezi dvanáctníkem a žaludkem. Pankreas se skládá z exokrinních, duktálních a endokrinních buněk⁸. Exokrinní buňky vytváří trávicí enzymy, jako jsou amylasy, lipasy, proteasy a nukleasy. Endokrinní buňky jsou formovány do shluků buněk, které jsou nazývány Langerhansovy ostrůvky. Ty se skládají z několika typů buněk a to α , β , δ , ϵ a PP, které produkují hormony, jako jsou glukagon, inzulín, somatostatin, ghrelin a pankreatický polypeptid⁹.

2.2.1 Využití pluripotentních kmenových buněk – Buněčná terapie

Pluripotentní kmenové buňky (PSCs) se mohou stát kteroukoliv buňkou ze všech zárodečných vrstev, což otevírá možnosti k získání inzulín sekretujících buněk k léčbě diabetu¹⁰. Existují dva typy pluripotentních kmenových buněk: embryonální (ESC), získané z tkáně vnitřní blastocysty a indukované (iPS), získané přeprogramováním somatických buněk. Thomson a jeho kolegové¹¹ byli první, kdo popsal kultivaci embryonálních pluripotentních kmenových buněk, čímž započala éra reprogramování somatických buněk. Podmínky přeprogramování jsou jak pro ESC, tak pro iPS stejné, což umožňuje využití indukovaných pluripotentních kmenových buněk bez etických zákazů spojených s využitím buněk nenarozeného embrya a jeho destrukcí. Vlastní lidské indukované kmenové buňky nejsou odstraněny po transplantaci imunitním systémem, nicméně je zde riziko spojené s odmítnutím implantované inzulín produkující buňky stejným autoimunitním mechanismem, který vedl k propuknutí diabetu.

⁶ Borisov et al.

⁷ Fong Cheng Pan a Chris Wright

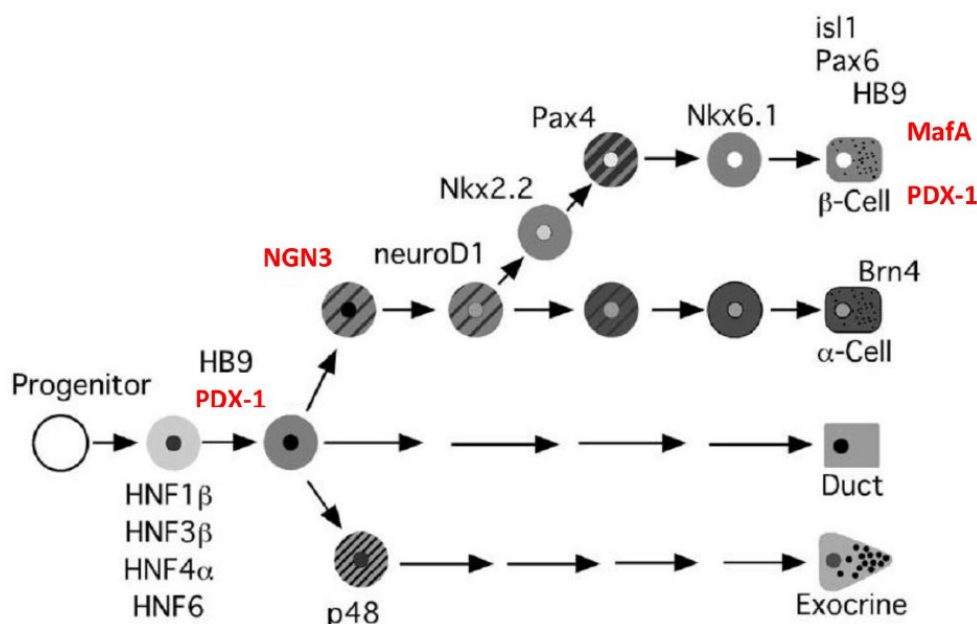
⁸ Cecil M. Benitez, William R. Goodyer, a Seung K. Kim

⁹ Borisov et al.

¹⁰ Qiao Zhou et al.

¹¹ J. A. Thomson a V. S. Marshall

Oba typy buněk mohou být plně diferenciovány *in vitro* až do stadia inzulin sekretující buňky. Diferenciace PSCs na inzulin produkující buňky probíhá dle jasné definovaného postupu skládajícího se z několika fází¹². První fází je vznik buňky endodermální lišty. Druhou fází pankreatické diferenciace je vystavení buněk dorsomorfínu nebo jeho homologu 1, který způsobí vznik Pdx1 progenitoru¹³. Následným působením dalších transkripčních faktorů vznikne úplně diferenciovaná buňka produkující inzulin. Vývoj z progenitorové buňky až do fáze β buňky je zobrazen na obrázku č. 1.



Obrázek 1: Model vývoje z pankreatické buňky na β buňku s důležitými transkripčními faktory. (Převzato z ¹⁴)

2.2.2 Pdx1

Transkripční faktor Pdx1 je protein, který se skládá z 283 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je 30771 Da¹⁵.

Pancreatic and duodenal homeobox 1 je jedním z mnoha transkripčních faktorů, které se účastní diferenciace progenitorových buněk na pankreatické buňky¹⁶. Exprese Pdx1 se mění podle stadia vývoje slinivky. Z počátku vývoje pankreatu je míra exprese transkripčního faktoru Pdx1 vysoká, když se tvoří epiteliální buňky. Při další diferenciaci

¹² Takatsugu Yamada et al.

¹³ Qiao Zhou a Douglas A. Melton

¹⁴ Š. Loukotová

¹⁵ <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PDX1>.

¹⁶ Jonghyeob Lee et al.

jeho exprese klesá, pouze při tvorbě endokrinních β buněk znovu roste¹⁷. Bylo zjištěno, že transkripční faktor Pdx1 je esenciální pro vznik β buněk, neboť jeho nepřítomnost, i když až v pozdní fázi vývoje, vede ke snížení proliferační schopnosti inzulín sekretujících buněk a zvýšení proliferace buněk produkujících glukagon¹⁸. Podmíněnou inaktivací exprese tohoto transkripčního faktoru u dospělých β buněk dojde ke zvýšení glykemie a snížená hladina Pdx1 může být spojena až s dysfunkcí β buněk¹⁹. Samotné Pdx1 je schopno aktivovat endogenní expresi inzulínu i v jiných typech buněk, než jsou β buňky. Pdx1 také reguluje expresi řady genů důležitých pro funkci β buněk a glukózou stimulovanou sekreci inzulínu²⁰.

2.2.3 Syntetická mRNA

Syntetickou mRNA je potenciálně možné využít k léčbě nemocí, které jsou způsobeny chybějící nebo defektní syntézou proteinů²¹. Využití *in vitro* transkribované mediátorové RNA (IVT mRNA) v léčbě je značné, a to hned z několika důvodů. Synteticky připravená mRNA nemusí být přenesena do jádra jako DNA, neboť je transkripčně aktivní již v cytoplasmě; nezačleňuje se do buněčného genomu, tedy nehrozí inserční mutagenese²². IVT mRNA pro specifické transkripční faktory již byla úspěšně použita pro přípravu indukovaných pluripotentních kmenových buněk odvozených ze somatických buněk bez nutnosti použití virových vektorů²³. Výroba IVT mRNA je relativně jednoduchá a levná, další výhodou je také její krátká aktivita v rámci buňky a fyziologická degradace²⁴.

Princip využití syntetické mRNA spočívá v přenosu určité genetické informace, která vede k léčbě pomocí prevence či změně určitého stavu. Například IVT mRNA pro transkripční faktor Pdx1, který se účastní vývoje pankreatických buněk a diferenciace β buněk Langerhansových ostrůvků²⁵. Při genetickém reprogramování je možné využít metodu přenosu IVT mRNA do pacientovy buňky *ex vivo* a takto transfekovanou buňku

¹⁷ Talitha van der Meulen a Mark O. Huising

¹⁸ Borisov et al.

¹⁹ van der Meulen a Huising

²⁰ John Le Lay a Roland Stein

²¹ Britta Vallazza et al.

²² Ugur Sahin, Katalin Karikó, a Özlem Türeci

²³ Heidrun Steinle et al.

²⁴ Sahin, Karikó, a Türeci

²⁵ van der Meulen a Huising

následně vrátit do těla pacienta²⁶. Aby se synteticky připravená mRNA co nejvíce podobala mRNA eukaryotické buňky, je nutné, aby byla jednovláknová a skládala se z určitých částí, a to čepičky na 5'konci a poly(A) sekvencí na 3'konci. Samotná překládaná oblast je navíc ohraničená iniciačním a stop kodonem a nepřekládanými oblastmi na obou stranách.

IVT mRNA je syntetizována mimo buňku z DNA templátu, který je připraven linearizací plasmidu a jeho amplifikací pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Templát obsahuje veškeré strukturní elementy funkční mRNA až na 5'čepičku. Samotnou *in vitro* transkripci zajišťuje T7 nebo SP6 RNA polymeráza za přítomnosti nukleotidů a převráceného analogu čepičky (ARCA)²⁷. Mediátorové ribonukleové kyseliny, které nejsou očepičkovány pomocí analogu čepičky jsou následně očepičkovány enzymaticky²⁸. Templátová DNA je poté rozštěpena DNasami a mRNA je následně purifikována konvenčními metodami pro izolování nukleových kyselin.

²⁶ Sahin, Karikó, a Türeci

²⁷ Malwina Strenkowska et al.

²⁸ Sahin, Karikó, a Türeci

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použitý materiál

Affymetrix (USA) – Poly(A) Polymerase, Yeast

Cellscript (USA) - T7 mScript™ Standard mRNA Production System

Life Technologies (USA) - Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse IgG, MEGAclean™ Kit Purification for Large Scale Transcription Reactions

Thermo Fisher Scientific (USA) - NucBlue® Fixed Cell Stain ReadyProbes™ reagent – DAPI, Opti-MEM® Reduced Serum Media, Qubit® RNA BR Assay Kit, Lipofectamine® MessengerMAX™ Reagent mRNA Transfection kit, Ambion® Anti-Reverse Cap Analog (ARCA), RNAsecure™ Reagent

New England Biolabs (USA) - Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase, NEBuffer 4, Antarctic Phosphatase (antarktická fosfatasa)

Qiagen (NL) - RNeasyPlus® Mini Kit, QIAgen® Plasmid Midi Kit

Sigma-Aldrich (USA) – Mowiol-DABCO®, EDTA, ethanol, FBS, HBSS, chlorid lithný, Triton X-100, trypsin

3.2 Použité přístroje

Analytické váhy - OHAUS Corp., VP64C (USA)

Automatické mikropipety - BioHit (Finsko)

Centrifugy - Hettich Micro 200, 220 R, Universal 320R, Rotanta 460R (Švýcarsko)

Inkubátor - HeraTherm, Thermo Scientific (USA)

Laminární box - ESCO, Airstream PCR (Singapur), HeraSafe KS, Thermo Scientific (USA)

Mikroskop - Evos FL Auto, Life Technologies (USA)

PCR termocyklery - Applied Biosystems, Veriti (USA), Biometra Tpersonal (SRN)

Předvážky - Ohaus, Scout (Švýcarsko)

3.3 Použité metody

3.3.1 Amplifikace templátu pro syntézu mRNA

Amplifikace DNA byla provedena pomocí metody polymerasové řetězové reakce (PCR). Reakce byla provedena podle protokolu výrobce kitu Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase. Reakce PCR proběhla s následujícím složením směsi, viz tabulka č. 1. Teplotní program je zobrazen v tabulce č. 2.

Tabulka 1: Složení reakční směsi pro PCR reakci

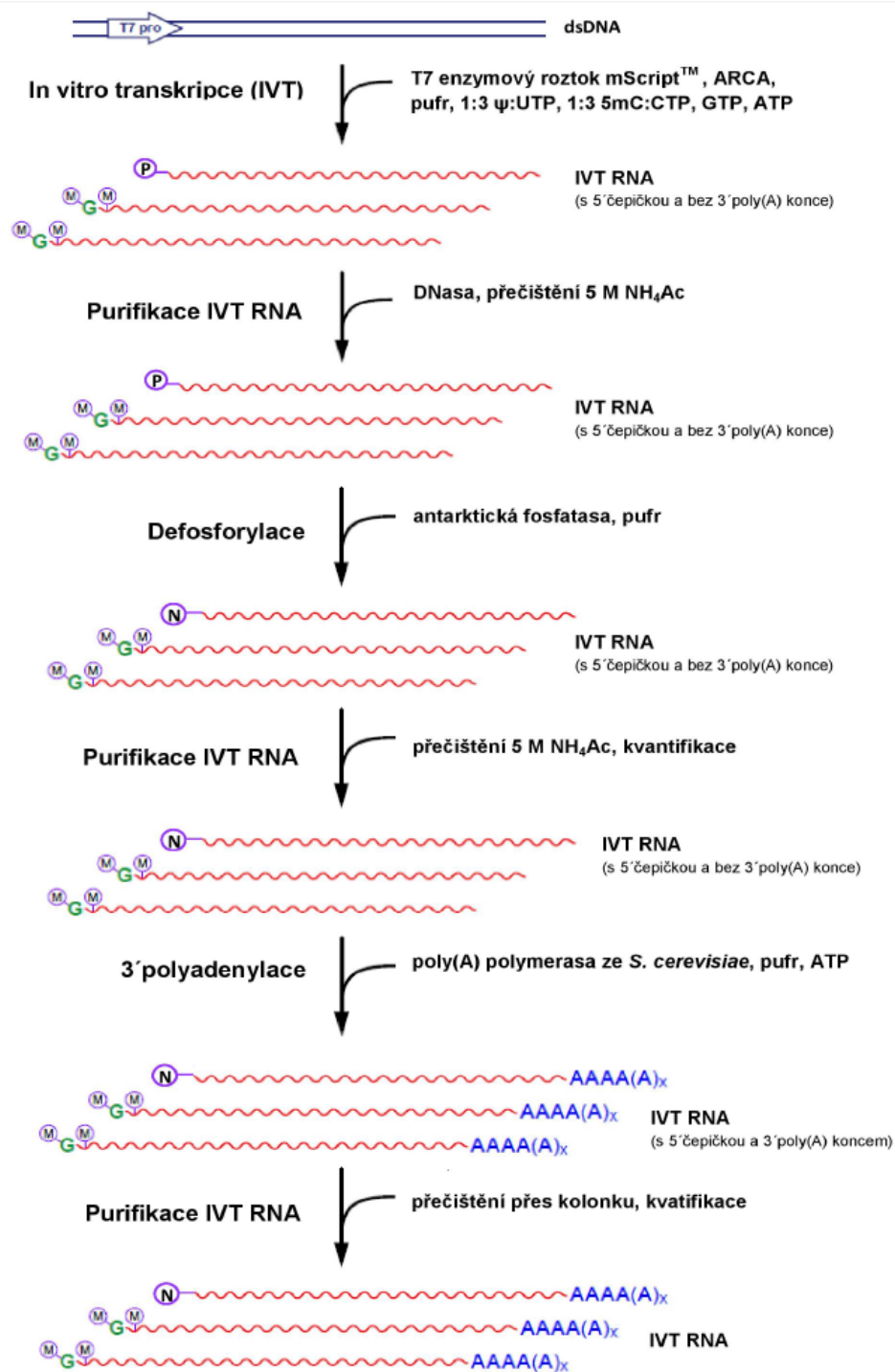
| Složení reakční směsi | Objem (μl) |
|----------------------------------|--------------|
| 5x Q5 reakční pufr | 30 |
| 5x Q „High GC Enhancer“ | 30 |
| 10 mM dNTP | 3,0 |
| 10 μM forward primer | 6,0 |
| Templát cDNA (PDX1) | 1,0 (100 ng) |
| „Nuclease-free“ H ₂ O | 70 |
| Q5 DNA polymerasa | 4,0 |

Tabulka 2: Časový a teplotní program PCR reakce

| Doba trvání | Teplota | Proces |
|-------------|---------------|-------------------|
| 20 s | 98 °C | Denaturace |
| 30 s | 55 °C | Nasedání primeru |
| 2 min | 72 °C | Tvorba produktu |
| | 30x opakování | |
| 2 min | 72 °C | Dokončení syntézy |

3.3.2 In vitro transkripce

K provedení syntézy mRNA z DNA templátu byl použit kit T7 mScript™ Standard mRNA Production System. Schéma celé *in vitro* transkripce je na obrázku č. 2.



Obrázek 2: Schéma postupu při *in vitro* transkripci mRNA. Nejprve je z linearizovaného templátu DNA přepsána mRNA, a zároveň dojde k inkorporaci 5' čepičky v podobě ARCA analogu. Následně se provede rozštěpení DNA templátu pomocí DNasy a zbavení templátu DNA z reakční směsi. mRNA je následně vystavena působení antarktické fosfatasy. Poté dochází k polyadenylaci pomocí poly(A) polymerasy ze *Saccharomyces cerevisiae*. Převzato z ²⁹.

²⁹ Loukotová

Celkem bylo připraveno 6 různých vzorků, které se v některých částech lišily přípravou, jejich označení a rozdíl v přípravě je zobrazen v tabulce č. 3. Tyto rozdíly budou zmíněny i u jednotlivých kroků přípravy.

Tabulka 3: Způsob přípravy jednotlivých mRNA a jejich označení

| Název | Rozdíly v přípravě | Doba zahřátí na 65 °C před defosforylací a polyadenylací |
|---------------|-----------------------------------|--|
| PDX1 OLD | Precipitace, bez mražení | 5 min |
| PDX1 FILTR | Filtrace | 5 min |
| PDX1 PREC | Precipitace, opakované mražení | 5 min |
| PDX1 CAP | Filtrace, enzymatické čepičkování | 5 min |
| PDX1 HEAT | Filtrace | 10 min |
| PDX1 COOL | Filtrace | 1 min |

Směs nukleotidů, které byly potřeba k reakci byly vypočteny podle zastoupení v templátu, jednotlivá množství nukleotidů jsou znázorněna v tabulce č. 4.

Tabulka 4: Směs nukleotidů potřebných pro *in vitro* transkripci

| Nukleotid | Počet NTP | Procentuální zastoupení (%) | Objem na 10μl reakci (μl) (c = 100 mM) | Počet dávkování a objem (μl) | Koncentrace (mM) |
|-----------|-----------|-----------------------------|---|------------------------------|------------------|
| ATP | 223 | 21 | 1,1 | 1 x 1,1 | 5,5 |
| CTP | 413 | 38 | 1,6 | 1 x 1,6 | 8,0 |
| GTP | 314 | 29 | 1,2 | 4 x 0,3 | 1,5 |
| UTP | 131 | 12 | 0,6 | 1 x 0,5 | 5,0 |
| ARCA | | | 1,5 | | 7,5 |

Složka UTP byla namíchána ze směsi 5'-methylpseudouridin-5'-trifosfátu a uridin-5'-trifosfátu, složka CTP pak z 5'-methylcytidin-5'-trifosfátu a cytidin-5'-trifosfátu.

Směs 25% 5mPU (4,0 μ l) = 1,0 μ l 5mPU + 3,0 μ l U

Směs 25% 5mC (4,0 μ l) = 1,0 μ l 5mC + 3,0 μ l C

Roztok GTP o celkovém objemu 6,7 μ l vznikl smícháním 2 μ l roztoku GTP a 4,7 μ l „Nuclease-free“ H₂O. Výsledná koncentrace tohoto roztoku byla 30 nM/ μ l.

Přibližně čtvrtina tohoto roztoku byla přidána do směsi a poté bylo přidáváno třikrát 1,5 μ l GTP k reakční směsi po uplynutí 20-30 minut. Celková reakční doba činila tedy 120 minut. Složení směsi pro samotnou *in vitro* transkripci je zobrazeno v tabulce č. 5.

Tabulka 5: Složení reakční směsi *in vitro* transkripce

| Složka | Objem (μ l) |
|--|---------------------|
| Lineární templát DNA (900 ng/reakce) | 12,0 |
| Roztok ATP (100 nM/ μ l) | 2,25 |
| ARCA (Anti reverse cap analog) (100 nM/ μ l) | 2,25 |
| GTP roztok (30 nM/ μ l) | 1,50 |
| 25% 5mC/CTP (100 nM/ μ l) | 2,40 |
| 25% mPU/UTP (100 nM/ μ l) | 0,90 |
| DTT (100 mM) | 3,00 |
| Inhibitor RNas | 1,50 |
| 10x koncentrovaný reakční pufr | 3,30 |
| Enzymatická směs | 1,50 |
| Anorganická pyrofosfatasa (0,1 U/ μ l) | 0,75 |
| Celkový objem | 30,0 |

3.3.3 Purifikace

Purifikace byla provedena přidáním 2 μ l DNasy a následným temperováním 20 minut při 37 °C. K roztoku byla následně přidána disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové o objemu 3 μ l a koncentraci 500 mM. Extrakce čistého produktu byla provedena filtrováním přes filtr 30 K Nanosep stočením při rychlosti 5000 G po dobu

25 min, a teplotě 10 °C. Dále pak bylo ještě 2x přidáno 450 µl „Nuclease-free“ vody a opět stočeno. Takto byly připraveny vzorky PDX1 FILTR, CAP, HEAT a COOL. Vzorky byly vytemperovány na 65 °C a to FILTR a CAP po dobu 5 minut, HEAT po dobu 10 minut a COOL po dobu 1 minuty.

Místo filtrace přes kolonku byla použita precipitace chloridem lithným u vzorků OLD a PREC. Precipitát byl promyt 70% ethanolem a následně rozpuštěn ve vodě (nuclease-free) vytemperované na 65 °C. Při této teplotě byly oba vzorky ponechány po dobu 5 minut. Vzorek PREC byl na rozdíl od vzorku OLD po zahřátí opakovaně inkubován po dobu 5–10 minut při – 20 °C.

U vzorku CAP bylo kromě čepičkování pomocí ARCA analogu provedeno enzymatické čepičkování. To probíhalo po dobu 45 minut při teplotě 37 °C, složení směsi je uvedeno v tabulce č. 6.

Tabulka 6: Reakční směs pro enzymatické čepičkování

| Složka | Objem (µl) |
|--|------------|
| „Nuclease-free“ H ₂ O + mRNA | 36,0 |
| Roztok GTP (20nM/µl) | 2,50 |
| Roztok SAM (20nM/µl) | 1,25 |
| 10x koncentrovaný ScriptCap čepičkovací pufr | 5,00 |
| Inhibitor RNas | 0,50 |
| ScriptCap 2'-O-Methyltransferasa | 2,00 |
| ScriptCap čepičkovací enzym | 2,00 |

3.3.4 Defosforylace a polyadenylace

U všech šesti vzorků byla provedena defosforylace pomocí antarktické fosfatasy. Polyadenylace byla provedena pomocí poly(A) polymerasy ze *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabulka 7: Reakční směs pro polyadenylaci

| Složka | Objem (μl) |
|---|------------|
| „Nuclease-free“ H ₂ O + mRNA | 38,0 |
| Roztok ATP (100 nM/μl) | 0,75 |
| 5x koncentrovaný reakční pufr | 10,0 |
| Inhibitor RNas | 0,50 |
| Enzymatický mix | 0,75 |

3.3.5 Transfekce

Transfekce vzorků PDX1 byla provedena pomocí Lipofectamine® MessengerMAX™ Reagent mRNA Transfection Protocol. Transfekovány byly buněčné linie karcinomu duktálních buněk pankreatu (PANC-1).

3.3.6 Imunofluorescenční stanovení exprese transkripčního faktoru Pdx1

Stanovení kvality různých druhů mRNA transfekovaných do buněčné linie karcinomu duktálních buněk pankreatu (PANC-1) bylo provedeno pomocí nepřímé imunofluorescence. Tyto buňky byly nasazené na 96 jamkové destičce a rozmístěny dle tabulky č. 8.

Tabulka 8: Schéma transfekovaných buněk pomocí vzorků PDX1 zobrazující množství transfekované mRNA

| Doba mezi transfekcí a imunofluorescenčním barvením (h) | PDX1 OLD (ng) | | PDX1 FILTR (ng) | | PDX1 PREC (ng) | | PDX1 CAP (ng) | | PDX1 HEAT (ng) | | PDX1 COOL (ng) | |
|---|---------------|----|-----------------|----|----------------|----|---------------|----|----------------|----|----------------|----|
| 24 | 100 | 50 | 100 | 50 | 100 | 50 | 100 | 50 | 100 | 50 | 100 | 50 |
| 48 | 100 | 50 | 100 | 50 | 100 | 50 | 100 | 50 | 100 | 50 | 100 | 50 |

Nejprve byly buňky třikrát promyty od média 200 μl HBSS s 1% FBS (Hank's balanced salt solution, fetal bovine serum). Následně byla provedena fixace po dobu 20 minut pomocí 100 μl 4% formaldehydu při pokojové teplotě. Promytí bylo provedeno třikrát 200 μl roztoku PBS. Blokovací roztok byl namíchan z promývacího roztoku (PBS s 0,1M glycinem (7,5 mg/ml), 0,05% Tritonem X) a 5% donkey séra. Do každé jamky bylo přidáno 100 μl blokovacího roztoku, inkubace probíhala 30 minut při pokojové teplotě.

Jako primární protilátka byla použita myši proti Pdx1, která byla ředěna v poměru 1:100 v ředícím roztoku Dako. Do každé jamky bylo přidáno 100 µl roztoku primární protilátky. Inkubace probíhala po dobu 30 minut a při teplotě 37 °C v inkubátoru. Následně byly jamky promyty třikrát 200 µl roztoku PBS. Jako sekundární fluorescenčně značená protilátka byla použita Alexa Fluor 555 proti primární myši protilátce, jejíž detekční barva je červená. Tato protilátka byla naředěna v blokovacím roztoku (složení viz výše) v poměru 1:400 a do každé jamky bylo přidáno 100 µl. Inkubace probíhala 30 minut při teplotě 37 °C za tmy. Poté byly jamky třikrát promyty 200 µl PBS. Dále byla přidána fluorescenční barva DAPI ředěná v PBS v poměru 1:13 o celkovém objemu 86 µl. Inkubace probíhala při pokojové teplotě 5 minut a ve tmě. Následně byly jamky promyty třikrát 200 µl PBS. Poté bylo přidáno 50 µl Mowiol-DABCO. Snímky byly pořízeny na inverzním fluorescenčním mikroskopu EVOS FL Auto při stonásobném zvětšení.

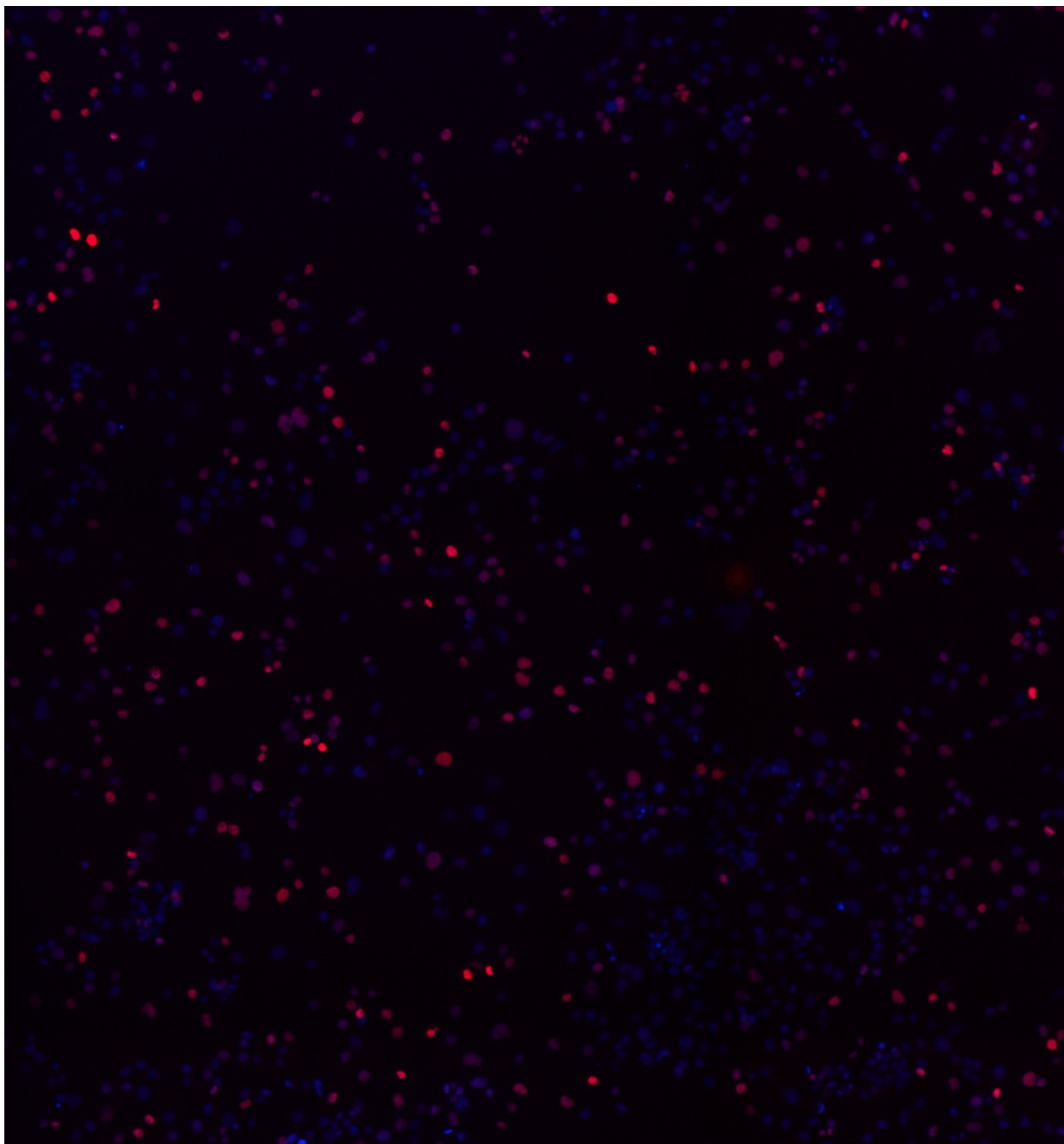
3.3.7 Imunofluorescenční stanovení exprese transkripčního faktoru Pdx1 pro detekci pomocí fluorescenční průtokové cytometrie

Buňky karcinomu pankreatu byly nasazeny do 24-jamkové destičky. Celkem bylo 6 vzorků, každý připravený jiným způsobem, viz výše. Jako kontroly byly použity buňky, kdy k jedné nebyla přidána mRNA a k druhé nebyla přidána primární protilátka proti Pdx1. Nejdříve bylo odsáto médium a následně byly omyty FACS roztokem (PBS, 0,2% FSG, azid) na každou jamku bylo přidáno 100 µl. Poté bylo přidáno 500 µl trypsinu a inkubace probíhala do viditelného uvolnění buněk, přibližně 2 minuty při teplotě 37 °C. Buňky byly poté přeneseny do 96-jamkové destičky s kulatým dnem a stočeny v centrifuze rychlostí 400 G po dobu 2 minut při 5 °C. Nadbytečný roztok byl odstraněn a v jamce byly ponechány pouze pelety. Blokace Fc receptorů byla provedena přidáním 50 µl 10% goat séra ve FACS roztoku na jamku, inkubace probíhala 10 minut na ledu. Následně byly buňky promyty přidáním 100 µl roztoku, stočeny na centrifuze při 400 G po dobu 2 minut při 5 °C, přebytečný roztok odstraněn, znovu přidáno 100 µl FACS roztoku, stočení proběhlo za stejných podmínek a přebytečný roztok odstraněn.

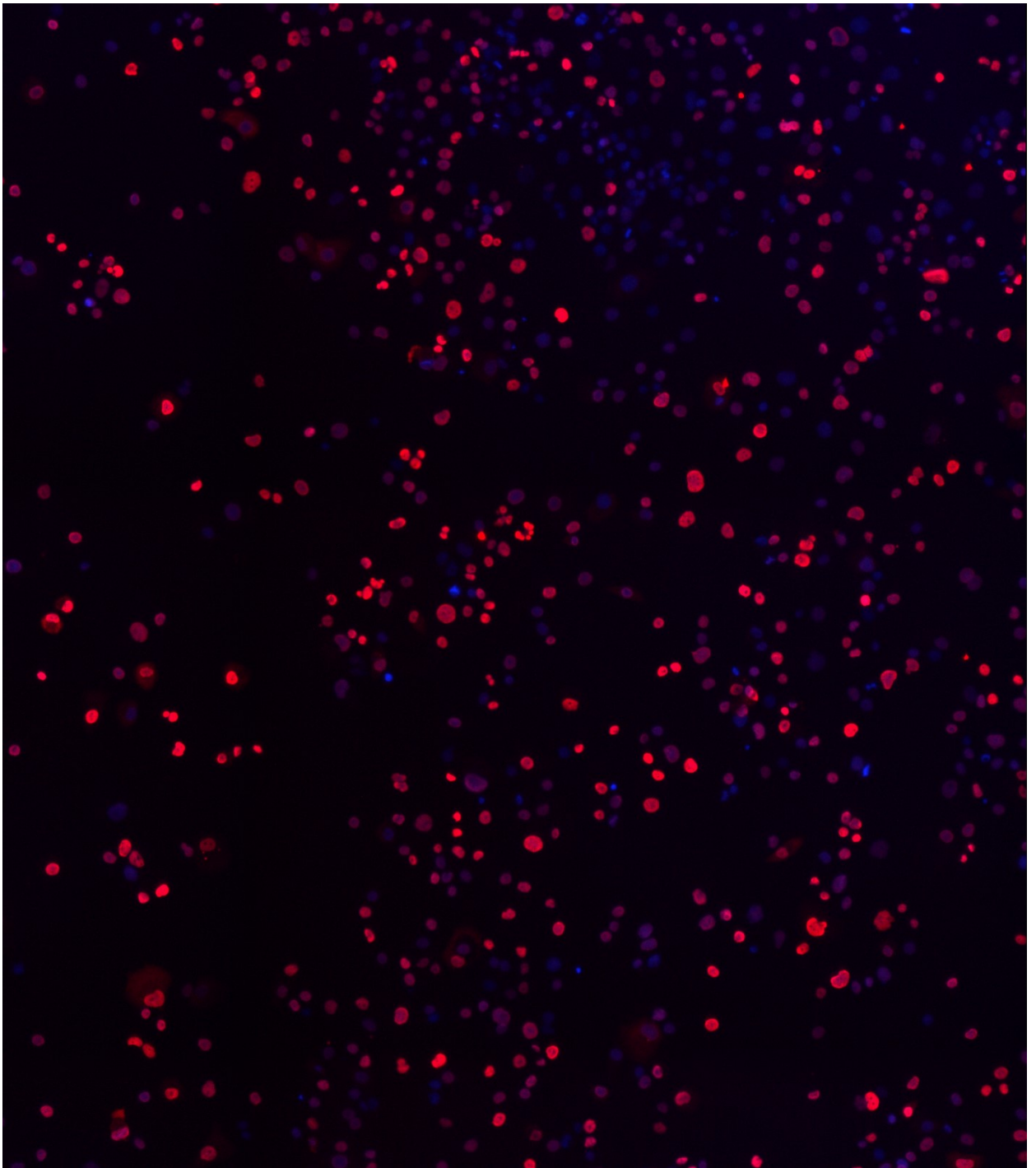
Fixační-permeabilizační roztok byl naředěn v poměru 1:3 s permeabilizačním ředícím roztokem, do každé jamky bylo přidáno 100 µl. Destička byla promíchána na vortexu a následně inkubována po dobu 45 minut na ledu ve tmě. Zásobní roztok permeabilizačního roztoku je 10x koncentrovaný, proto byl 10x ředěný s deionizovanou vodou. K buňkám bylo přidáno 100 µl permeabilizačního roztoku, ty byly následně stočeny při rychlosti 400 G po dobu 2 minut a teplotě 5 °C, přebytečný roztok odstraněn a

buňky byly opět promyty permeabilizačním roztokem. K buňkám bylo přidáno 50 μ l 2% Donkey séra v permeabilizačním pufru, inkubace probíhala 15 minut na ledu. Primární protilátka byla myší proti Pdx1, ta byla naředěna 1:100 v permeabilizačním pufru a přidána k buňkám, inkubace trvala 60 minut na ledu ve tmě. Poté byly jamky dvakrát promyty permeabilizačním pufrem (200 μ l na jamku). Sekundární protilátka Alexa Fluor 555 proti myší primární protilátce byla ředěna 1:400 v permeabilizačním pufru s 2% Donkey sérem, do každé jamky bylo přidáno 50 μ l, inkubace probíhala 60 minut na ledu ve tmě. Následně byly jamky promyty dvakrát permeabilizačním pufrem (2x 200 μ l), poté stočeny při 400 G na 2 minuty při 5 °C, přebytečný roztok byl odstraněn a bylo přidáno 100 μ l permeabilizačního roztoku. Následně byla provedena FACS analýza.

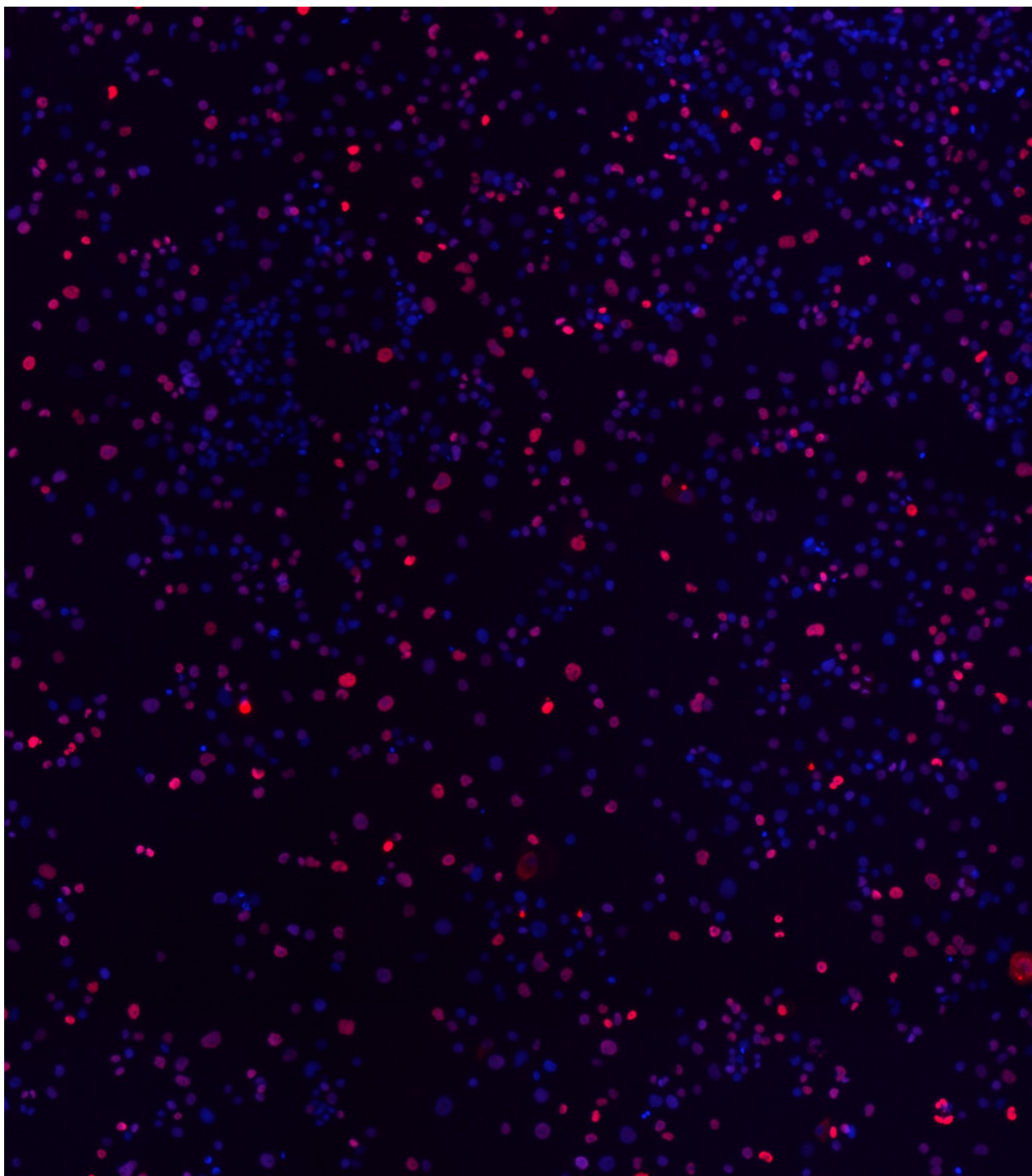
4. VÝSLEDKY



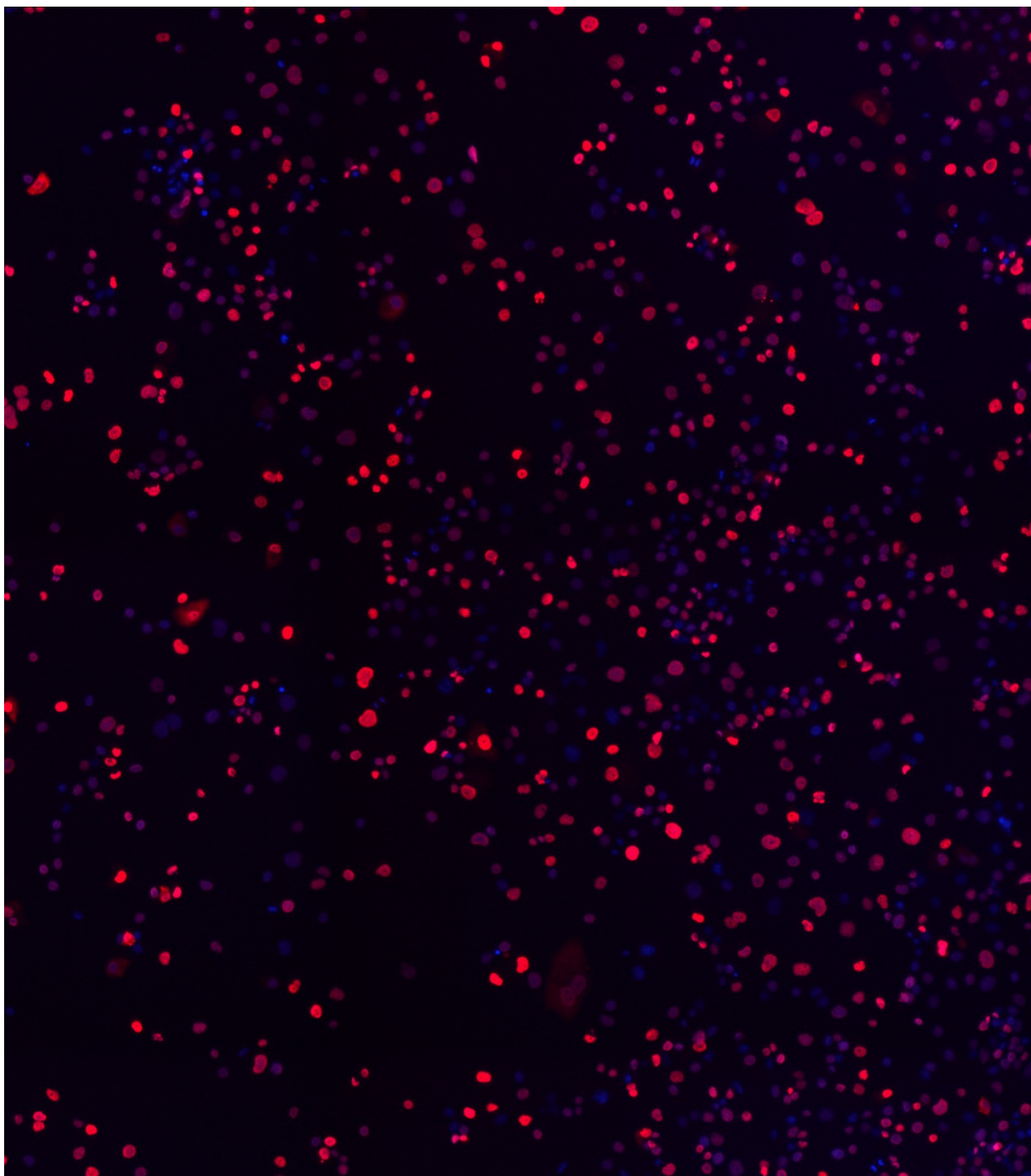
Obrázek 3: Imunofluorescenčně značené buněčné linie karcinomu duktálních buněk pankreatu (PANC-1) transfekované mRNA pro transkripční faktor Pdx1 vzorkem PDX1 OLD. Fluorescenční značení bylo provedeno 24 hodin po transfekci. Buňky jsou značené modrou barvou DAPI navázanou na DNA a červenou barvou jsou značeny buňky pozitivní na přítomnost proteinu Pdx1 pomocí primární myší protilátky proti Pdx1, sekundární protilátkou je imunofluorescenčně značená protilátka Alexa Fluor 555 proti primární myší protilátce. Obrázek byl vyfocen při stonásobném zvětšení inverzním fluorescenčním mikroskopem EVOS FL Auto.



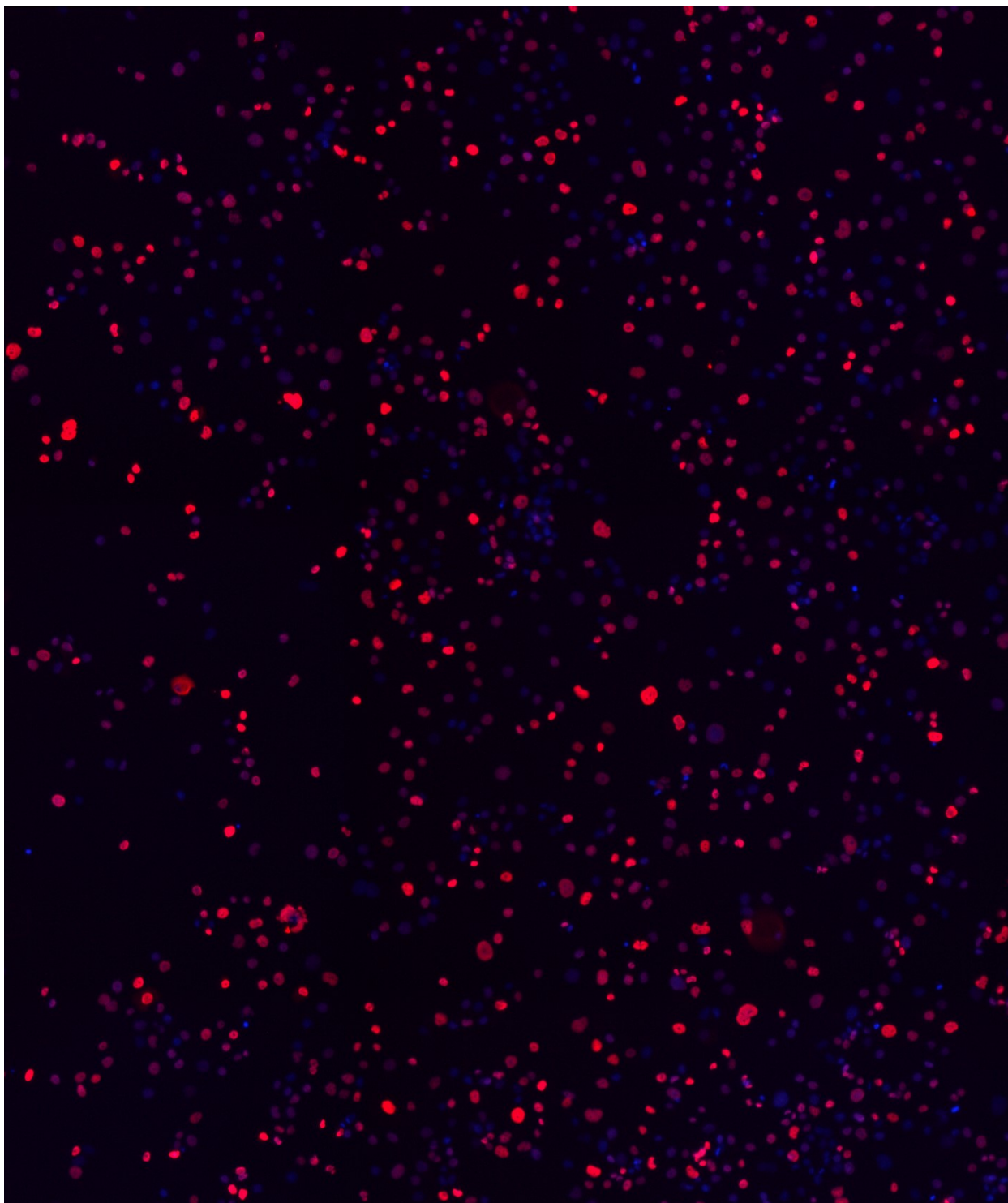
Obrázek 4: Imunofluorescenčně značené buněčné linie karcinomu duktálních buněk pankreatu (PANC-1) transfekované mRNA pro transkripční faktor Pdx1 vzorkem PDX1 FILTR. Fluorescenční značení bylo provedeno 24 hodin po transfekci. Buňky jsou značené modrou barvou DAPI navázanou na DNA a červenou barvou jsou značeny buňky pozitivní na přítomnost proteinu Pdx1 pomocí primární myší protilátky proti Pdx1, sekundární protilátkou je imunofluorescenčně značená protilátka Alexa Fluor 555 proti primární myší protilátce. Obrázek byl vyfocen při stonásobném zvětšení inverzním fluorescenčním mikroskopem EVOS FL Auto.



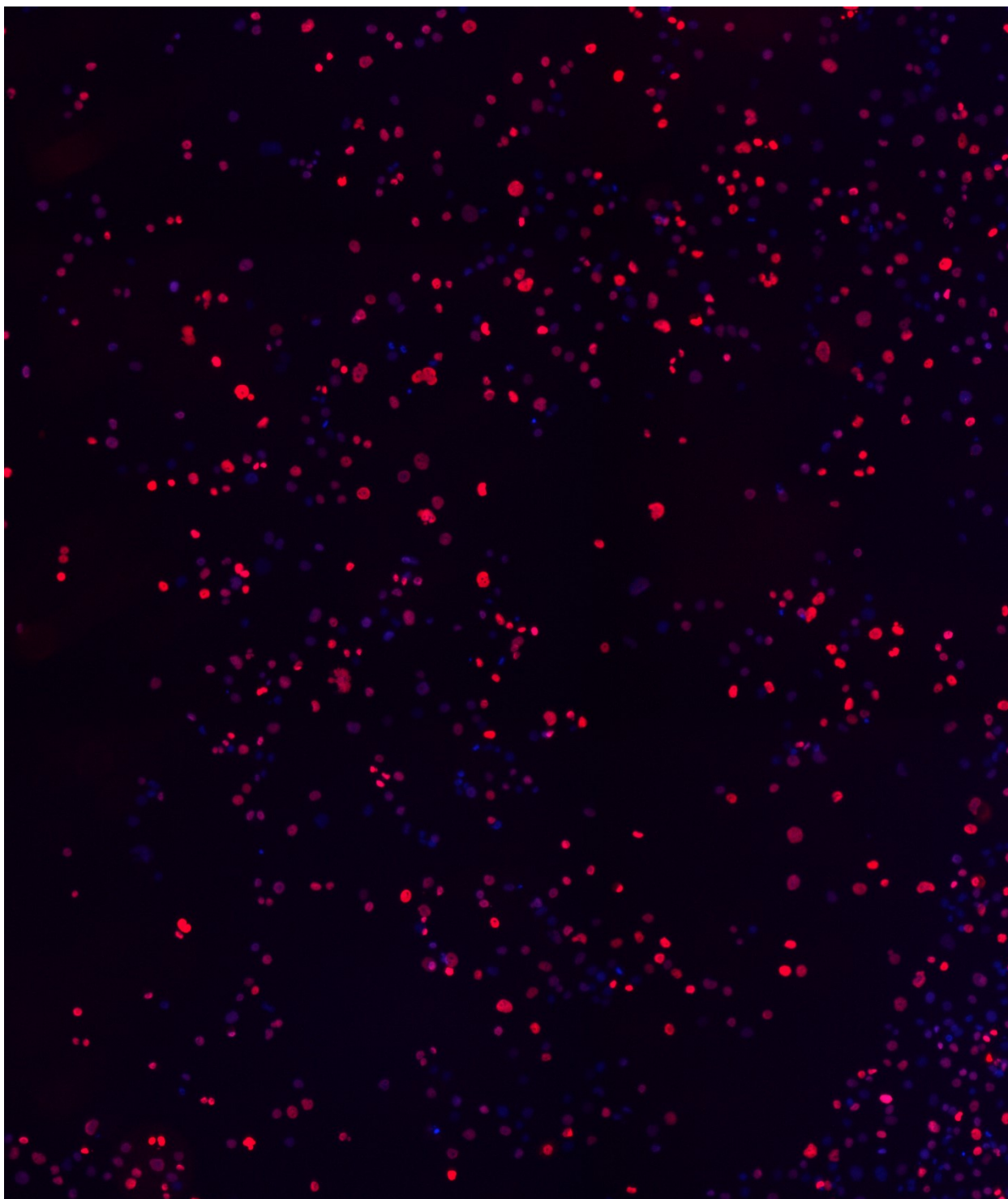
Obrázek 5: Imunofluorescenčně značené buněčné linie karcinomu duktálních buněk pankreatu (PANC-1) transfekované mRNA pro transkripční faktor Pdx1 vzorkem PDX1 PREC. Fluorescenční značení bylo provedeno 24 hodin po transfekci. Buňky jsou značené modrou barvou DAPI navázanou na DNA a červenou barvou jsou značeny buňky pozitivní na přítomnost proteinu Pdx1 pomocí primární myší protilátky proti Pdx1, sekundární protilátkou je imunofluorescenčně značená protilátka Alexa Fluor 555 proti primární myší protilátce. Obrázek byl vyfocen při stonásobném zvětšení inverzním fluorescenčním mikroskopem EVOS FL Auto.



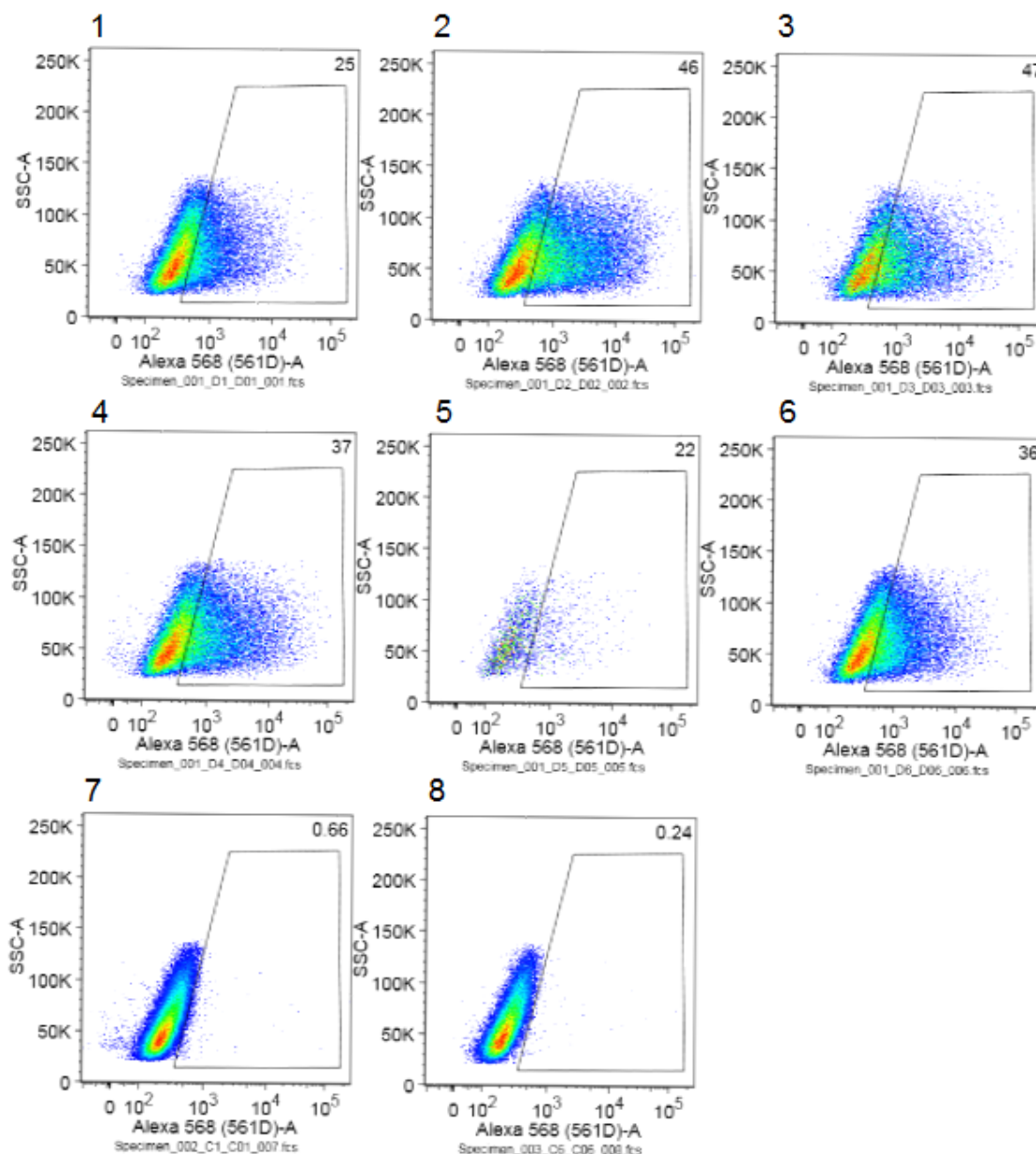
Obrázek 6: Imunofluorescenčně značené buněčné linie karcinomu duktálních buněk pankreatu (PANC-1) transfekované mRNA pro transkripční faktor Pdx1 vzorkem PDX1 CAP. Fluorescenční značení bylo provedeno 24 hodin po transfekci. Buňky jsou značené modrou barvou DAPI navázanou na DNA a červenou barvou jsou značeny buňky pozitivní na přítomnost proteinu Pdx1 pomocí primární myší protilátky proti Pdx1, sekundární protilátkou je imunofluorescenčně značená protilátka Alexa Fluor 555 proti primární myší protilátce. Obrázek byl vyfocen při stonásobném zvětšení inverzním fluorescenčním mikroskopem EVOS FL Auto.



Obrázek 7: Imunofluorescenčně značené buněčné linie karcinomu duktálních buněk pankreatu (PANC-1) transfekované mRNA pro transkripční faktor Pdx1 vzorkem PDX1 HEAT. Fluorescenční značení bylo provedeno 24 hodin po transfekci. Buňky jsou značené modrou barvou DAPI navázanou na DNA a červenou barvou jsou značeny buňky pozitivní na přítomnost proteinu Pdx1 pomocí primární myší protilátky proti Pdx1, sekundární protilátkou je imunofluorescenčně značená protilátka Alexa Fluor 555 proti primární myší protilátce. Obrázek byl vyfocen při stonásobném zvětšení inverzním fluorescenčním mikroskopem EVOS FL Auto.



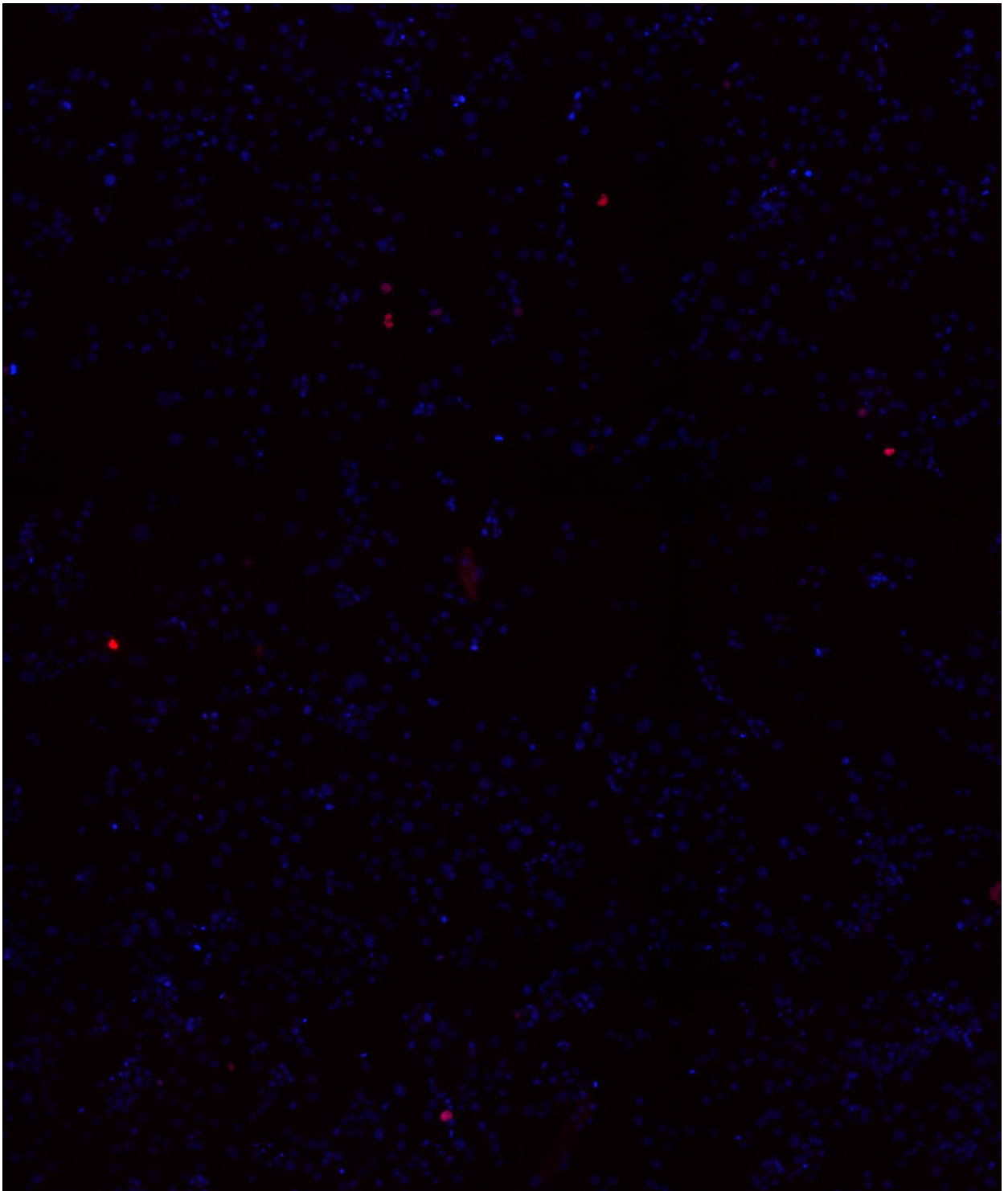
Obrázek 8: Imunofluorescenčně značené buněčné linie karcinomu duktálních buněk pankreatu (PANC-1) transfekované mRNA pro transkripční faktor Pdx1 vzorkem PDX1 COOL. Fluorescenční značení bylo provedeno 24 hodin po transfekci. Buňky jsou značené modrou barvou DAPI navázanou na DNA a červenou barvou jsou značeny buňky pozitivní na přítomnost proteinu Pdx1 pomocí primární myší protilátky proti Pdx1, sekundární protilátkou je imunofluorescenčně značená protilátka Alexa Fluor 555 proti primární myší protilátce. Obrázek byl vyfocen při stonásobném zvětšení inverzním fluorescenčním mikroskopem EVOS FL Auto.



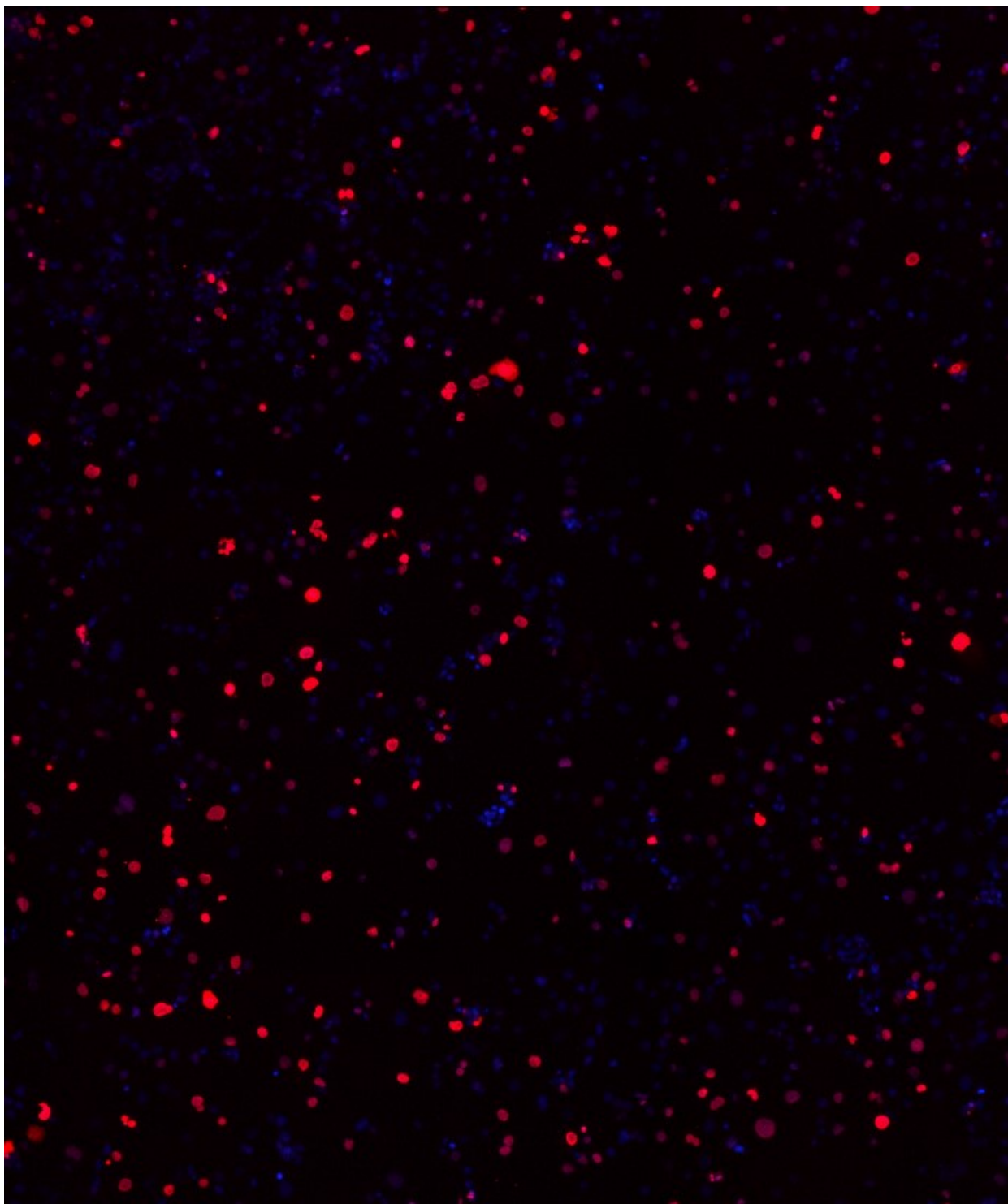
Obrázek 9: Výsledky FACS analýzy imunofluorescenčně značených buněčných linií karcinomu duktálních buněk pankreatu (PANC-1) transfekovaných mRNA pro vzorky transkripčního faktoru Pdx1. Fluorescenční značení bylo provedeno 24 hodin po transfekci. Buňky jsou značeny primární myší protilátkou proti proteinu Pdx1, sekundární protilátkou je imunofluorescenčně značená protilátka Alexa Fluor 555 proti primární myší protilátce. Souřadnice y značí velikost buněk. Souřadnice x pak označuje rostoucí intenzitu fluorescenčního záření. Ohraničené pole u každého vzorku obsahuje pozitivní buňky na transkripční faktor Pdx1, číselný údaj nad tímto polem znamená procentuální zastoupení pozitivních buněk vůči celkovému počtu. Vzorky byly měřeny v tomto pořadí:

- 1 – PDX1 OLD
- 2 – PDX1 FILTR
- 3 – PDX1 PREC
- 4 – PDX1 CAP
- 5 – PDX1 HEAT
- 6 – PDX1 COOL

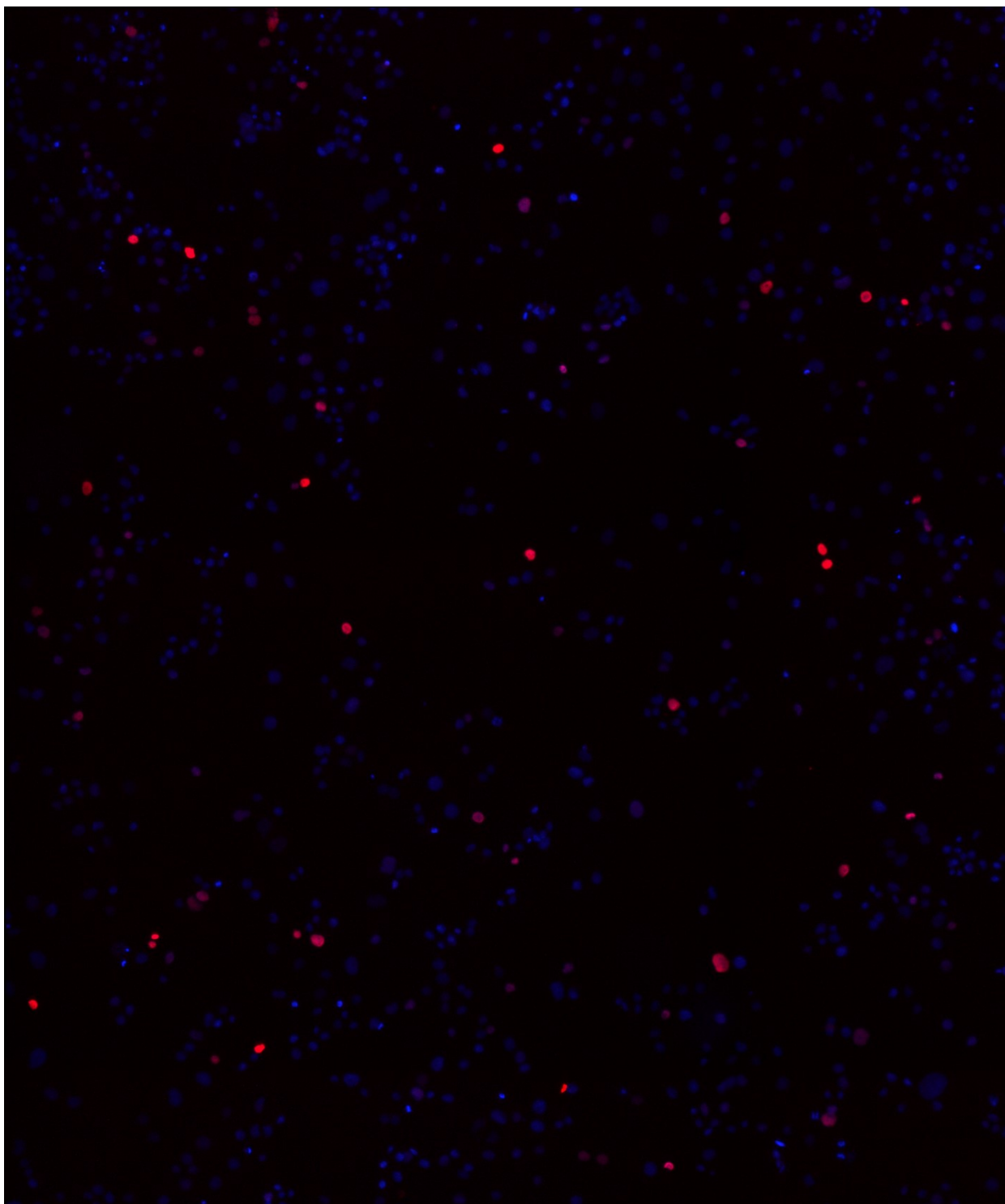
- 7 – PANC-1 buňky bez transfekované mRNA pro PDX1
- 8 – PANC-1 buňky bez transfekované mRNA pro PDX1 a bez primární protilátky proti Pdx1



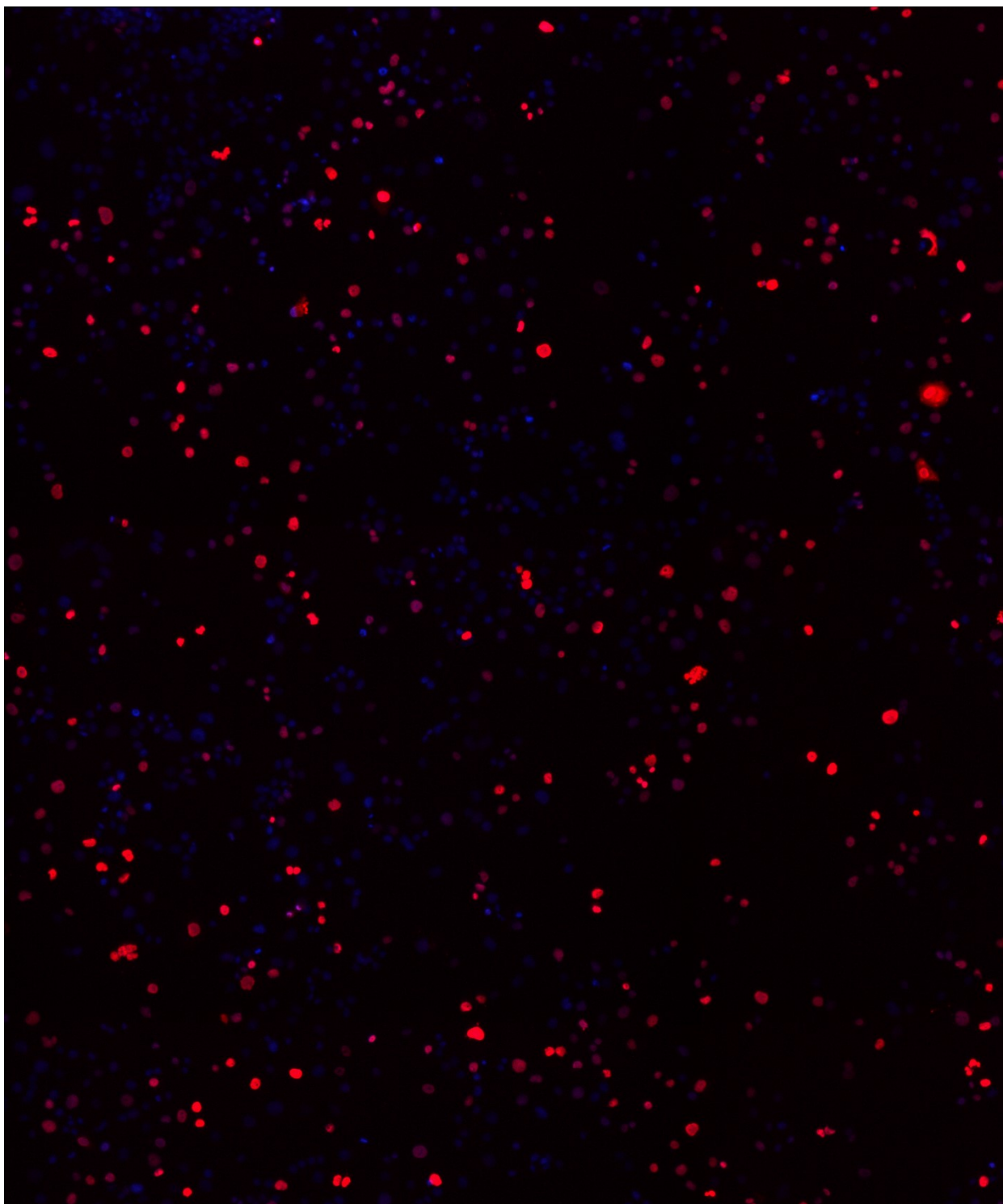
Obrázek 10: Imunofluorescenčně značené buněčné linie karcinomu duktálních buněk pankreatu (PANC-1) transfekované mRNA pro transkripční faktor Pdx1 vzorkem PDX1 OLD. Fluorescenční značení bylo provedeno 48 hodin po transfekci. Buňky jsou značené modrou barvou DAPI navázanou na DNA a červenou barvou jsou značeny buňky pozitivní na přítomnost proteinu Pdx1 pomocí primární myší protilátky proti Pdx1, sekundární protilátkou je imunofluorescenčně značená protilátka Alexa Fluor 555 proti primární myší protilátce. Obrázek byl vyfocen při stonásobném zvětšení inverzním fluorescenčním mikroskopem EVOS FL Auto.



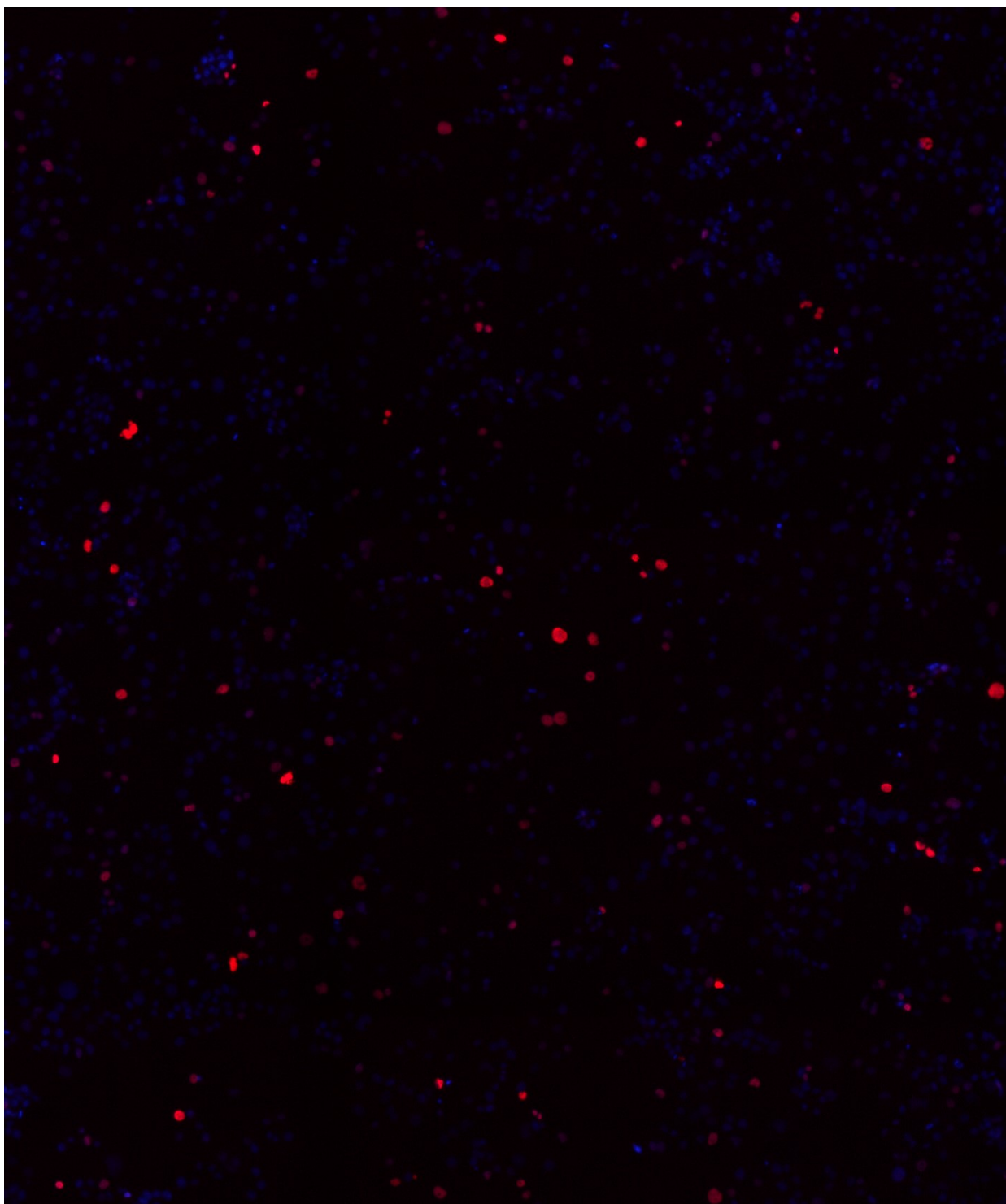
Obrázek 11: Imunofluorescenčně značené buněčné linie karcinomu duktálních buněk pankreatu (PANC-1) transfekované mRNA pro transkripční faktor Pdx1 vzorkem PDX1 FILTR. Fluorescenční značení bylo provedeno 48 hodin po transfekci. Buňky jsou značené modrou barvou DAPI navázanou na DNA a červenou barvou jsou značeny buňky pozitivní na přítomnost proteinu Pdx1 pomocí primární myší protilátky proti Pdx1, sekundární protilátkou je imunofluorescenčně značená protilátka Alexa Fluor 555 proti primární myší protilátce. Obrázek byl vyfocen při stonásobném zvětšení inverzním mikroskopem EVOS FL Auto.



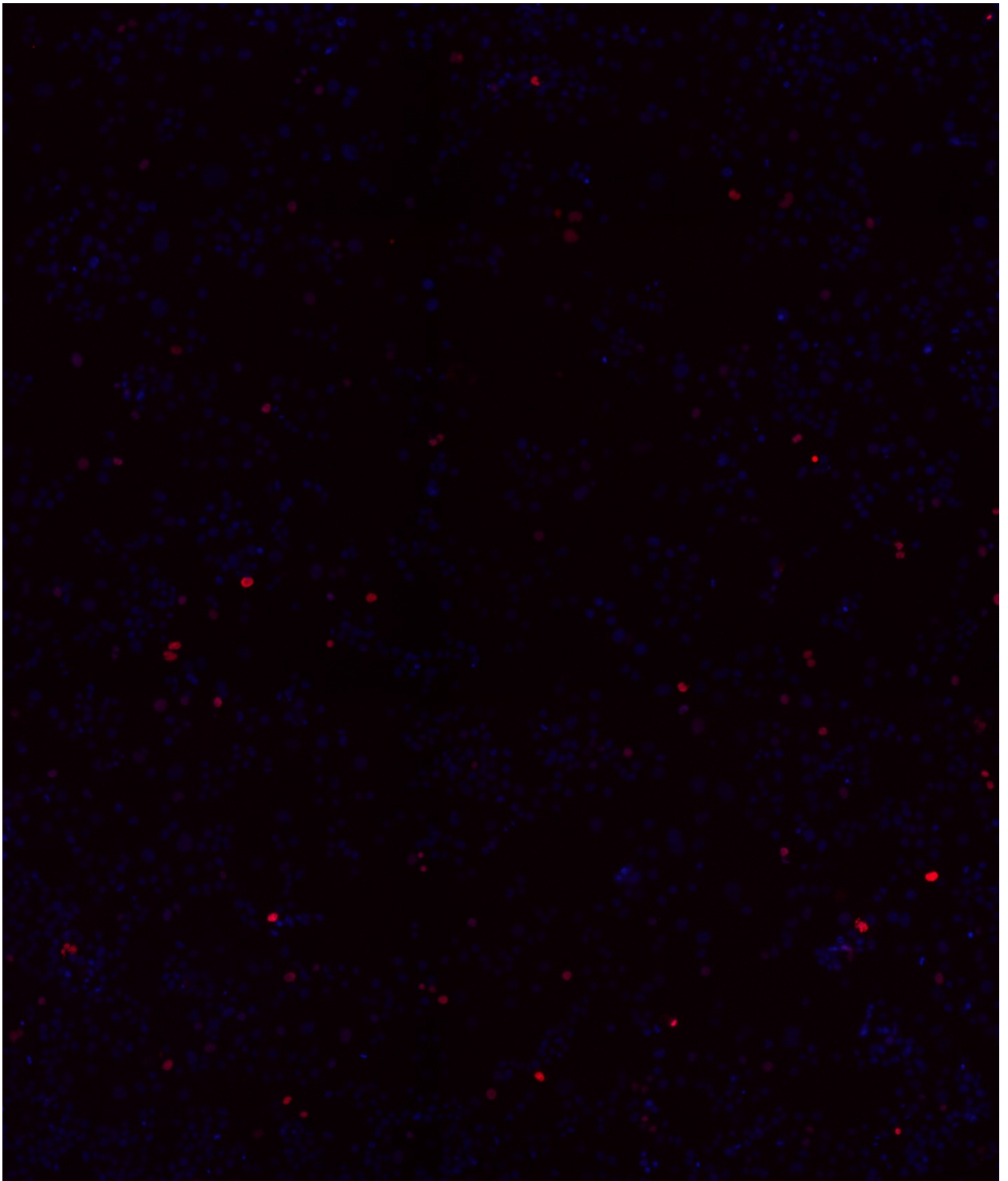
Obrázek 12: Imunofluorescenčně značené buněčné linie karcinomu duktálních buněk pankreatu (PANC-1) transfekované mRNA pro transkripční faktor Pdx1 vzorkem PDX1 PREC. Fluorescenční značení bylo provedeno 48 hodin po transfekci. Buňky jsou značené modrou barvou DAPI navázanou na DNA a červenou barvou jsou značeny buňky pozitivní na přítomnost proteinu Pdx1 pomocí primární myší protilátky proti Pdx1, sekundární protilátkou je imunofluorescenčně značená protilátka Alexa Fluor 555 proti primární myší protilátce. Obrázek byl vyfocen při stonásobném zvětšení inverzním mikroskopem EVOS FL Auto.



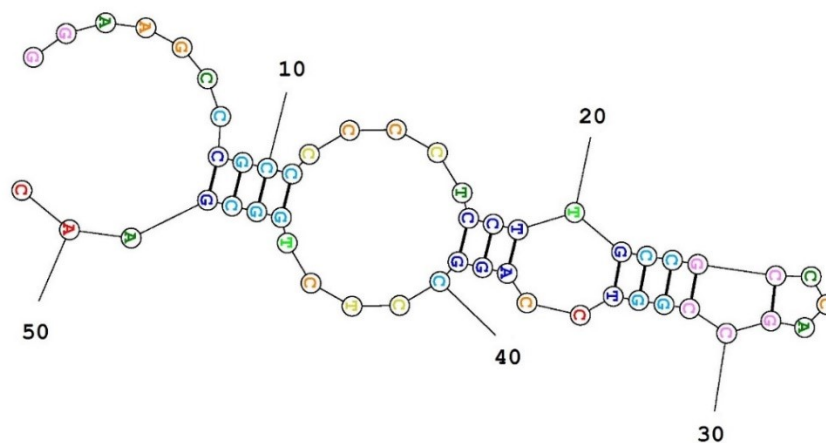
Obrázek 13: Imunofluorescenčně značené buněčné linie karcinomu duktálních buněk pankreatu (PANC-1) transfekované mRNA pro transkripční faktor Pdx1 vzorkem PDX1 CAP. Fluorescenční značení bylo provedeno 48 hodin po transfekci. Buňky jsou značené modrou barvou DAPI navázanou na DNA a červenou barvou jsou značeny buňky pozitivní na přítomnost proteinu Pdx1 pomocí primární myší protilátky proti Pdx1, sekundární protilátkou je imunofluorescenčně značená protilátka Alexa Fluor 555 proti primární myší protilátce. Obrázek byl vyfocen při stonásobném zvětšení inverzním mikroskopem EVOS FL Auto.



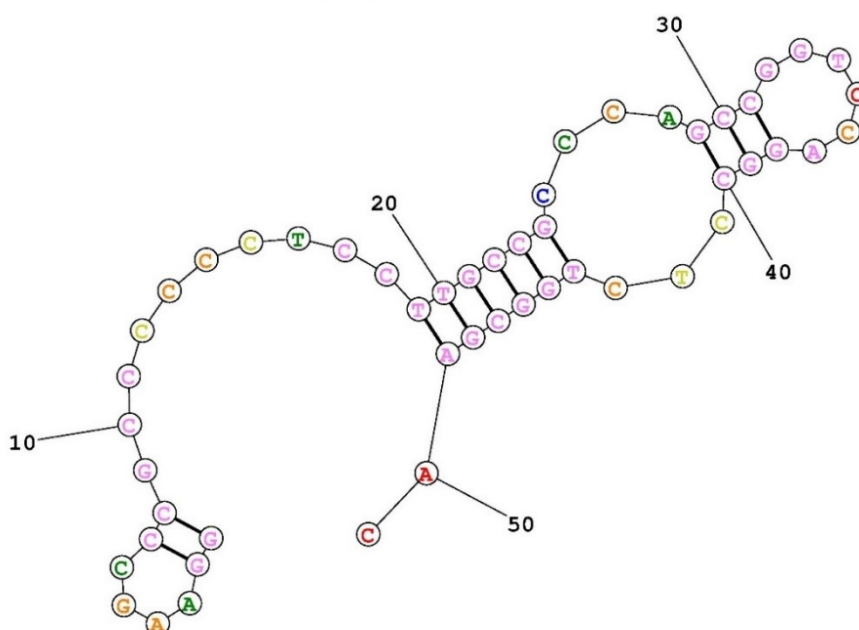
Obrázek 14: Imunofluorescenčně značené buněčné linie karcinomu duktálních buněk pankreatu (PANC-1) transfekované mRNA pro transkripční faktor Pdx1 vzorkem PDX1 HEAT. Fluorescenční značení bylo provedeno 48 hodin po transfekci. Buňky jsou značené modrou barvou DAPI navázanou na DNA a červenou barvou jsou značeny buňky pozitivní na přítomnost proteinu Pdx1 pomocí primární myší protilátky proti Pdx1, sekundární protilátkou je imunofluorescenčně značená protilátka Alexa Fluor 555 proti primární myší protilátce. Obrázek byl vyfocen při stonásobném zvětšení inverzním mikroskopem EVOS FL Auto.



Obrázek 15: Imunofluorescenčně značené buněčné linie karcinomu duktálních buněk pankreatu (PANC-1) transfekované mRNA pro transkripční faktor Pdx1 vzorkem PDX1 COOL. Fluorescenční značení bylo provedeno 48 hodin po transfekci. Buňky jsou značené modrou barvou DAPI navázanou na DNA a červenou barvou jsou značeny buňky pozitivní na přítomnost proteinu Pdx1 pomocí primární myší protilátky proti Pdx1, sekundární protilátkou je imunofluorescenčně značená protilátka Alexa Fluor 555 proti primární myší protilátce. Obrázek byl vyfocen při stonásobném zvětšení inverzním fluorescenčním mikroskopem EVOS FL Auto.



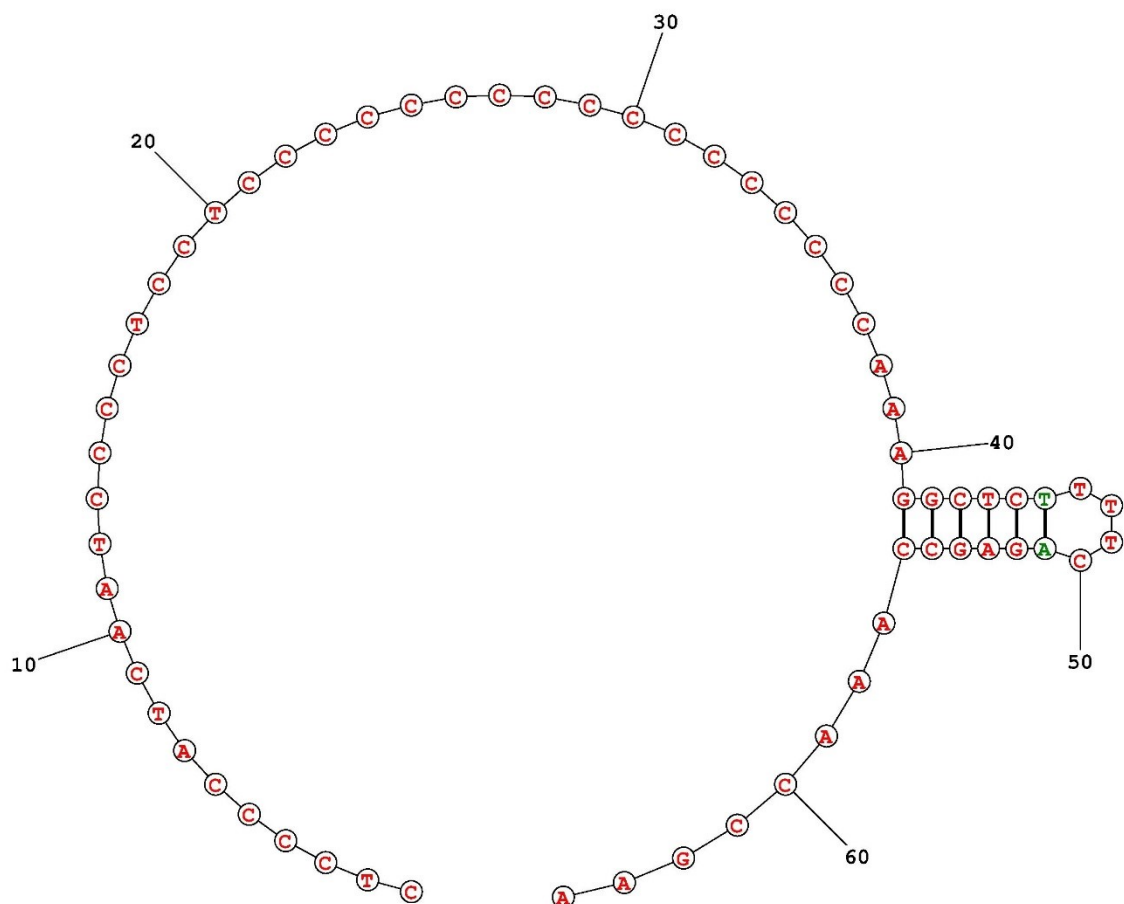
Probability >= 99%
 99% > Probability >= 95%
 95% > Probability >= 90%
 90% > Probability >= 80%
 80% > Probability >= 70%
 70% > Probability >= 60%
 60% > Probability >= 50%
 50% > Probability
 ENERGY = -13.5 05/12/17 08:06:31



Probability >= 99%
 99% > Probability >= 95%
 95% > Probability >= 90%
 90% > Probability >= 80%
 80% > Probability >= 70%
 70% > Probability >= 60%
 60% > Probability >= 50%
 50% > Probability
 ENERGY = -12.4 05/12/17 08:06:31

Obrázek 16: Predikované sekundární struktury 5' nepřekládaných oblastí pomocí programu RNA structure³⁰

³⁰ <http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html>. (převzato 12.5.2017)



Probability >= 99%
 99% > Probability >= 95%
 95% > Probability >= 90%
 90% > Probability >= 80%
 80% > Probability >= 70%
 70% > Probability >= 60%
 60% > Probability >= 50%
 50% > Probability

ENERGY = -9.5 05/12/17 08:11:04

Obrázek 17: Predikovaná sekundární struktura 3' nepřekládané oblasti pomocí programu RNA structure³¹

³¹ <http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html>. (převzato 12.5.2017)

5. DISKUSE

Cílem této práce bylo připravit syntetickou mRNA *in vitro* a porovnat různé postupy její přípravy, které zajistí nejstabilnější výsledek. Pro zvýšení stability a zároveň nezvýšení imunogenicity byly použity modifikované nukleotidy, a to 5'-methylcytidin-5'-trifosfát a 5'-methylpseudouridin-5'-trifosfát. Pouhou jejich přítomností dojde ke snížení nespecifické imunitní odpovědi v rámci buňky^{32,33}.

Při *in vitro* transkripci bylo na rozdíl od ostatních nukleotidů přidáváno GTP po částech a ne najednou. Poměr mezi ARCA analogem a GTP byl 4:1. To z toho důvodu, aby došlo přednostně k inkorporaci ARCA analogu. Neboť GTP konkuruje ARCA analogu o vazebné místo na iniciačním kodonu. K získání největšího počtu mRNA s ARCA analogem je tento postup optimální, přesto i při poměru ARCA ku GTP 10:1 je inkorporace ARCA analogu do mRNA pouze s 78% účinností³⁴. Většina vzorků byla očepičkováána pomocí ARCA analogu, ten patří do třídy čepiček typu 0, druhým typem je typ 1^{cit.35}. Z chemického hlediska je rozdílem mezi těmito typy čepičky methylace kyslíku na pozici 2'-O ribosy. Typ 0 se vyskytuje především u jednobuněčných eukaryotních organismů, zatímco typ 1 se nachází především u vyšších eukaryot. ARCA analog lze přeměnit na čepičku typu 1 methylací enzymem 2'-O-methyltransferasou. Této reakce se využívá při enzymatickém čepičkování, které bylo provedeno u jednoho vzorku, a to PDX1 CAP. Při reakci enzymatického čepičkování dojde k dotvoření čepičky i u mRNA, u které nebyl zabudován ARCA analog. Poté je tedy inkorporace buď ARCA analogu nebo 5'-methylguanosinové čepičky téměř 100%. Částečně tím lze vysvětlit vyšší míru translace u enzymaticky dočepičkované mRNA. To, zda-li je na 5'konci navázána čepička typu 0 nebo 1 má vliv na stabilitu mRNA. Při zavedení mRNA do buňky, má buňka mechanismus pro rozpoznávání cizorodé, především virové RNA. Pokud taková RNA nemá na sobě navázanou čepičku typu 1, ale typu 0 nebo je bez čepičky a má na 5'konci trifosfát, tak je buňkou rozpoznána a degradována. Dojde k aktivaci imunitního receptoru RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) a následné degradaci transfekované mRNA pomocí RNas³⁶.

³² Katalin Karikó et al.

³³ Norbert Pardi et al.

³⁴ Ewa Grudzien-Nogalska et al.

³⁵ viz ³⁴

³⁶ Swapnil C. Devarkar et al.

Pozorovaným faktorem bylo, zda-li má enzymatické čepičkování vliv na stabilitu mRNA. Mediátorová ribonukleová kyselina byla v předchozím kroku očepičkována pomocí ARCA analogu. Jediný enzymaticky očepičkovaný vzorek je na obrázcích č. 6 (str. 24) a č. 13 (str. 31). Na obou obrázcích lze pozorovat vysokou míru exprese mRNA, a to i po 48 hodinách od transfekce. Enzymatické čepičkování tedy zvyšuje stabilitu i míru exprese mRNA.

Jak již bylo zmíněno výše, na aktivaci RIG-I a následné degradaci se podílí i mRNA, která nemá na 5'konci čepičku, ale trifosfát. Aby se odstranila takováto mRNA, byla použita antarktická fosfatasa, která trifosfát odštěpí. Jinak by mohlo dojít i k vyvolání apoptózy buňky³⁷.

Z naměřených výsledků lze usoudit, že stabilita *in vitro* transkribované mRNA je ovlivněna její přípravou. Například, vzorek PDX1 OLD byl připravován bez optimalizace jednotlivých metod. Při porovnání obrázků tohoto vzorku na obrázcích číslo 3 a 10 na stranách 21 a 28 s jinými vzorky, lze pozorovat nejnižší míru exprese transkripčního faktoru Pdx1. To potvrzuje i výsledek FACS analýzy, který je zobrazen na stránce č. 27 a obrázku č. 9.

Při porovnání jednotlivých změn přípravy, lze odvodit optimalizace, které jsou vhodné pro stabilizaci transfekované mRNA. Například, jak je zřejmé z obrázků č. 4 (str. 22) a č. 5 (str. 23) při přípravě je vhodnější využití filtrace, než-li precipitace. To potvrzuje i porovnání obrázků č. 11 (str. 29) a č. 12 (str. 30), které zobrazují stejný způsob přípravy, avšak s tím rozdílem, že k imunofluorescenčnímu barvení došlo po 48 hodinách. Což znamená, že mRNA u vzorku PDX1 FILTR byla přítomna v buňkách déle, a i translace na protein Pdx1 probíhala delší dobu. Navíc podle výsledků FACS analýzy na obrázků č. 9 (str. 27) mají buňky transferované mRNA připravenou pomocí filtrace vyšší intenzitu exprese proteinu Pdx1 v jednotlivých buňkách. Ačkoliv byla transfekce precipitované mRNA o 1 % úspěšnější, filtrovaná mRNA je stabilnější a poskytuje vyšší míru exprese.

Také byly porovnávány vzorky, u kterých byla změněna doba zahřívání na 65 °C před defosforylací a polyadenylací na rozdíl od ostatních vzorků, kde zahřívání probíhalo 5 minut. Toto zahřívání je prováděno z důvodu denaturace, která následně umožní lepší průběh enzymatických reakcí, jako je právě polyadenylace a defosforylace. U vzorku

³⁷ Swapnil C. Devarkar et al.

PDX1 HEAT probíhalo zahřívání na 65 °C po dobu 10 minut, výsledek je zobrazen na obrázcích č. 7 (str. 25) a č. 14 (str. 32). Dalším vzorkem se změnou doby zahřívání byl vzorek PDX1 COOL, zde byla doba zahřívání zkrácena na 1 minutu. Výsledky jsou na obrázcích č. 8 (str. 26) a č. 15 (str. 33). Při barvení po 24 hodinách na obrázcích 7 a 8 (str. 25 a 26) nelze pozorovat výraznější rozdíl, avšak při barvení po 48 hodinách, obrázky 14 a 15 (str. 32 a 33) zobrazují, že je vhodnější doba temperace 10 minut. Vliv teploty na míru exprese však není zase tak významný, jako například u enzymatického versus neenzymatického čepičkování. Důvodem vyšší stability zahřívané mRNA může být to, že zahřátím se dvouvláknová RNA denaturuje a zvýší se tedy množství jednovláknové RNA, která není buňkou rozpoznávána jako virová³⁸. Na obrázcích č. 16 a 17 na straně 34 a 35 jsou zobrazeny predikované struktury 5' a 3' konce nepřekládaných oblastí. Tyto predikované struktury jsou volné a neměl by být tedy problém při průběhu enzymatických reakcí. To však nelze ověřit, proto se provádí teplotní denaturace. Ta se provádí zahřátím mRNA na 65 °C, čímž se sekundární struktury rozvolní a vlákno mRNA je tak přístupnější enzymům. To zajistí vznik struktury, která není degradována po transfekci do buňky. Vyšší míru exprese mRNA pro transkripční faktor Pdx1 lze pozorovat na obrázcích vzorku PDX1 HEAT. Pro potvrzení této domněnky bohužel nelze využít výsledky naměřené pomocí FACS analýzy, neboť u vzorku PDX1 HEAT došlo ke špatnému zpracování.

V rámci FACS analýzy byly provedeny i dvě kontrolní měření se vzorky, kdy jeden neobsahoval transfekovanou mRNA a druhý neobsahoval primární protilátku proti Pdx1 a nedošlo tedy k jejímu navázání. Buněčné linie karcinomu duktálních buněk pankreatu vykazují detekovatelné fluorescenční záření, které je však oproti vzorkům transferovaným syntetickou mRNA zanedbatelné.

Shrnutím těchto výsledků je tedy zjištění, že k získání nejvíce stabilní mRNA je vhodná optimalizace, a to v podobě filtrace mRNA při její purifikaci, využití jak ARCA analogu, tak enzymatického čepičkování a doba zahřátí před defosforylací a polyadenylací na 10 minut.

³⁸ Swapnil C. Devarkar et al.

6. ZÁVĚR

V rámci této práce bylo připraveno šest typů syntetické mediátorové ribonukleové kyseliny pro pankreatický transkripční faktor Pdx1. Pomocí analýzy stability těchto mRNA bylo zjištěno, že optimální formu mRNA lze připravit s využitím filtrace namísto precipitace, zahřátím vzorku na 65 °C po dobu 10 minut před enzymatickými reakcemi a využitím enzymatického čepičkování s tvorbou čepičky 1. typu.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- Benitez, Cecil M., William R. Goodyer, a Seung K. Kim. „Deconstructing Pancreas Developmental Biology". *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4, č. 6 (červen 2012).
- Borisov, M. A., O. S. Petrakova, I. G. Gvazava, E. N. Kalistratova, a A. V. Vasiliev. „Stem Cells in the Treatment of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus". *Acta Naturae* 8, č. 3 (2016).
- Devarkar, Swapnil C., Chen Wang, Matthew T. Miller, Anand Ramanathan, Fuguo Jiang, Abdul G. Khan, Smita S. Patel, a Joseph Marcotrigiano. „Structural Basis for m7G Recognition and 2'-O-Methyl Discrimination in Capped RNAs by the Innate Immune Receptor RIG-I". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, č. 3 (leden 2016).
- Ellis, Cara E., a Gregory S. Korbutt. „Justifying Clinical Trials for Porcine Islet Xenotransplantation". *Xenotransplantation* 22, č. 5 (září 2015).
- Grudzien-Nogalska, Ewa, Janusz Stepinski, Jacek Jemielity, Joanna Zuberek, Ryszard Stolarski, Robert E. Rhoads, a Edward Darzynkiewicz. „Synthesis of Anti-Reverse Cap Analogs (ARCAs) and Their Applications in mRNA Translation and Stability". *Methods in Enzymology* 431 (2007).
- Karikó, Katalin, Hiromi Muramatsu, Frank A. Welsh, János Ludwig, Hiroki Kato, Shizuo Akira, a Drew Weissman. „Incorporation of Pseudouridine into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector with Increased Translational Capacity and Biological Stability". *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 16, č. 11 (listopad 2008).
- Kwang-Won, K., a J. Sang-Man. „Is Islet Transplantation a Realistic Approach to Curing Diabetes?" *The Korean Journal of Internal Medicine* 32, č. 1 (leden 2017).
- Le Lay, John, a Roland Stein. „Involvement of PDX-1 in Activation of Human Insulin Gene Transcription". *The Journal of Endocrinology* 188, č. 2 (únor 2006).
- Lee, Jonghyeob, Takuya Sugiyama, Yinghua Liu, Jing Wang, Xueying Gu, Ji Lei, James F. Markmann, et al. „Expansion and Conversion of Human Pancreatic Ductal Cells into Insulin-Secreting Endocrine Cells". *eLife* 2 (listopad 2013).
- Loukotová, Š. „Příprava a charakterizace syntetické mRNA kódující pankreatické transkripční faktory". Praha. *Diplomová práce* (Mgr.). Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, (2015).
- Meulen, Talitha van der, a Mark O. Huising. „Role of Transcription Factors in the Transdifferentiation of Pancreatic Islet Cells". *Journal of Molecular Endocrinology* 54, č. 2 (duben 2015).
- Pan, Fong Cheng, a Chris Wright. „Pancreas Organogenesis: From Bud to Plexus to Gland". *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 240, č. 3 (březen 2011).

- Pardi, Norbert, Hiromi Muramatsu, Drew Weissman, a Katalin Karikó. „In Vitro Transcription of Long RNA Containing Modified Nucleosides". *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 969 (2013).
- „PDX1 Gene - GeneCards | PDX1 Protein | PDX1 Antibody". převzato 12. května 2017. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PDX1>.
- Sahin, Ugur, Katalin Karikó, a Özlem Türeci. „mRNA-Based Therapeutics--Developing a New Class of Drugs". *Nature Reviews. Drug Discovery* 13, č. 10 (říjen 2014).
- Steinle, Heidrun, Andreas Behring, Christian Schlensak, Hans Peter Wendel, a Meltem Avci-Adali. „Concise Review: Application of In Vitro Transcribed Messenger RNA for Cellular Engineering and Reprogramming: Progress and Challenges". *STEM CELLS* 35, č. 1 (leden 2017).
- Strenkowska, Malwina, Joanna Kowalska, Maciej Lukaszewicz, Joanna Zuberek, Wei Su, Robert E. Rhoads, Edward Darzynkiewicz, a Jacek Jemielity. „Towards mRNA with superior translational activity: synthesis and properties of ARCA tetraphosphates with single phosphorothioate modifications". *New journal of chemistry = Nouveau journal de chimie* 34, č. 5 (leden 2010).
- Thomson, J. A., a V. S. Marshall. „Primate Embryonic Stem Cells". *Current Topics in Developmental Biology* 38 (1998).
- Vallazza, Britta, Sebastian Petri, Marco A. Polegiov, Florian Eberle, Andreas N. Kuhn, a Ugur Sahin. „Recombinant Messenger RNA Technology and Its Application in Cancer Immunotherapy, Transcript Replacement Therapies, Pluripotent Stem Cell Induction, and beyond". *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA* 6, č. 5 (říjen 2015).
- Vanikar, Aruna V., Hargovind L. Trivedi, a Umang G. Thakkar. „Stem cell therapy emerging as the key player in treating type 1 diabetes mellitus". *Cytotherapy* 18, č. 9 (září 2016).
- „Welcome to the Predict a Secondary Structure Web Server". Převzato 12. května 2017. <http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html>.
- Yamada, Takatsugu, Claudia Cavelti-Weder, Francisco Caballero, Philippe A. Lysy, Lili Guo, Arun Sharma, Weida Li, Qiao Zhou, Susan Bonner-Weir, a Gordon C. Weir. „Reprogramming Mouse Cells With a Pancreatic Duct Phenotype to Insulin-Producing β -Like Cells". *Endocrinology* 156, č. 6 (červen 2015).
- Zhou, Qiao, Juliana Brown, Andrew Kanarek, Jayaraj Rajagopal, a Douglas A. Melton. „In Vivo Reprogramming of Adult Pancreatic Exocrine Cells to β -Cells". *Nature* 455, č. 7213 (říjen 2008).
- Zhou, Qiao, a Douglas A. Melton. „Extreme Makeover: Converting One Cell into Another". *Cell Stem Cell* 3, č. 4 (říjen 2008).